

**Dipartimento di Biologia**



**UNIVERSITÀ DI PISA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare e Cellulare (LM-6)**

**Tesi di Laurea Magistrale**

**ZIP9: un nuovo trasportatore di pioppo (*Populus x euroamericana*  
clone I-214) appartenente alla famiglia dei trasportatori ZIP**

**Candidato:**

Francesca Agnese Balducci  
Matricola 451973

**Relatore:**

Prof. Andrea Andreucci

**Anno Accademico 2014/2015**

# Indice

## Introduzione

1.1 Il suolo	3
1.2 Micro e Macro Nutrienti	4
1.3 Trasportatori dei metalli	6
1.4 Trasportatori ZIP	9
1.5 Meccanismi di tolleranza ai metalli	12
1.6 Inquinamento	15
1.7 Fitorisanamento	17
1.8 Definizione di Metalli Pesanti	21
1.9 Il Cadmio	22
1.10 Effetti dello stress da Cadmio	23
1.11 Il Pioppo	26
1.12 Effetti del cadmio sul Pioppo	27
1.13 Scopo della tesi	29

## Materiali e metodi

2.1 Clonaggio del gene <i>zip9</i> da cDNA di <i>P.x euroamericana</i> clone I-214	30
2.2 Clonaggio del gene <i>zip9</i> per la localizzazione subcellulare	35
2.3 Trasformazione dei protoplasti di <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.4 Trattamento con Cd di <i>Populus alba</i> L.clone Villafranca ed isolamento dell'RNA	45
2.5 Analisi dei livelli di espressione del gene <i>zip9</i>	46

## Risultati

3.1 Clonaggio del gene <i>zip9</i> da cDNA di <i>P.x euroamericana</i> clone I-214	48
3.2 Clonaggio del gene <i>zip9</i> per la localizzazione subcellulare	55
3.3 Osservazione al microscopio confocale dei protoplasti di <i>Arabidopsis</i> trasfettati con il costrutto pAVA554-YFP-Zip9	57
3.4 Analisi dei livelli di espressione del gene <i>zip9</i> nelle foglie di <i>P.alba</i> L.clone Villafranca sottoposto a trattamento con CdSO <sub>4</sub>	60

Discussione	62
-------------	----

Conclusioni e Prospettive per il futuro	68
---	----

Bibliografia	69
--------------	----

Ringraziamenti	79
----------------	----

# Introduzione

## 1.1- Il Suolo

Il suolo è il materiale non consolidato, di natura minerale o organica, che si trova sullo strato più superficiale della Terra e che costituisce il mezzo di crescita naturale per le piante terrestri. (Soil taxonomy, 1999).

È frutto dell'effetto che fattori, come il clima (acqua, temperatura e vento), la presenza di rilievi e l'azione che macro- e microrganismi, hanno avuto sul materiale di origine.

Il suolo risulta quindi dinamico poiché cambia continuamente la sua composizione con il passare del tempo.

I metalli presenti al suo interno si originano dal disfacimento naturale della roccia madre, dall'introduzione, durante attività agricole, di fertilizzanti naturali e fertilizzanti chimici, da depositi trasportati dall'acqua e dalla deposizione di polveri ed aerosol da parte di agenti atmosferici.

Il suolo presente in una determinata regione differisce, quindi, da quello formatosi in un'altra sia per la modalità di sviluppo che per la tipologia di roccia madre da cui deriva (<https://www.soils.org/discover-soils/soil-basics/how-do-soils-form>).

Le principali proprietà fisiche che caratterizzano il suolo sono la tessitura (percentuale in peso di sabbia, limo ed argilla), la struttura (disposizione tridimensionale delle particelle che lo compongono), la densità e la porosità (capacità di infiltrazione e ritenzione dell'acqua nonché il passaggio dell'aria).

Considerando le proprietà fisiche, chimiche e biologiche ed il suo eventuale utilizzo, il suolo è suddivisibile nelle seguenti tipologie (<https://www.soils.org/discover-soils/soil-basics/soil-types>):

- gelisol: interessato da permafrost
- histosol: suolo costituito principalmente da resti organici vegetali
- spodosol: suolo di tipo sabbioso, con accumulo di sostanza organica ed alluminio
- andisol: suolo di origine vulcanica, con sostanza organica stabilizzata dall'alluminio

- oxisol: suolo minerale con intenso dilavamento di silice e cationi
- vertisol: suolo ricco di argille espandibili
- aridisol: suolo delle regioni a clima secco, caratterizzato da accumuli salini
- ultisol: suolo argilloso povero di cationi di metalli alcalini ed alcalino-terrosi
- mollisol: suolo in cui la roccia madre è altamente modificata e ricco di sostanza organica
- alfisol: suolo argilloso ricco di cationi di metalli alcalini ed alcalino-terrosi
- inceptisol: suolo di origine recente in cui si hanno alterazione dei minerali primari
- entisol: suolo di origine recente e poco sviluppato

## 1.2- Micro e Macro Nutrienti

La piante sono organismi in grado di utilizzare come fonte di nutrimento i composti di natura inorganica presenti nel suolo senza dover quindi metabolizzare sostanze organiche ad alto contenuto energetico.

Gli elementi assorbiti dalla pianta possono essere suddivisi in essenziali e non essenziali.

I primi, per essere definiti tali, devono presentare le seguenti caratteristiche (Edwin F et al., 2008):

- non possono essere sostituiti da un altro elemento con proprietà chimico-fisiche simili;
- devono risultare necessari durante tutto il ciclo biologico della pianta quindi sia nella fase di sviluppo, che nella fase di accrescimento, che in quella di riproduzione;
- devono essere in forma “attiva” nella pianta;
- devono costituire o essere parte di un metabolita essenziale o costituente.

Gli elementi essenziali, a loro volta, possono essere suddivisi in microelementi e macroelementi.

Questi ultimi risultano essere necessari alle piante in quantità maggiori rispetto ai primi.

Un esempio di microelemento è rappresentato dallo zinco (Zn), di cui la pianta necessita per lo

sviluppo e la riproduzione in una concentrazione che varia dai 5 ai 100 mg kg<sup>-1</sup> (tabella 1.1 ed 1.2; Alloway, 2008). Un' alterazione degli elementi essenziali può avere un effetto negativo sulla fisiologia della pianta.

Macronutrienti (mM)	Forma disponibile per le cellule
Carbonio (C)	CO <sub>2</sub>
Ossigeno (O)	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub>
Idrogeno (H)	H <sub>2</sub> O
Azoto (N)	NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Potassio (K)	K <sup>+</sup>
Calcio (Ca)	Ca <sup>2+</sup>
Fosforo (P)	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Magnesio (Mg)	Mg <sup>2+</sup>
Zolfo (S)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>

**Tabella 1.1:** Macroelementi.

Micronutrienti (μM)	Forma disponibile per le Cellule
Ferro (Fe)	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>
Cloro (Cl)	Cl <sup>-</sup>
Rame (Cu)	Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>
Manganese (Mn)	Mn <sup>2+</sup>
Zinco (Zn)	Zn <sup>2+</sup>
Molibdeno (Mb)	Mo <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Boro (Bo)	H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>
Alluminio (Al)	Al <sup>3-</sup>
Cobalto (Co)	Co <sup>2+</sup>
Iodio (I)	I <sup>-</sup>
Nichel (Ni)	Ni <sup>2+</sup>

**Tabella 1.2:** Microelementi.

I Nutrienti possono inoltre essere classificati mediante un approccio di tipo fisiologico (Mengel and Kirkby, 2001), (tabella 1.3):

Nutrienti	Modalità di assorbimento	Funzione Biochimica
1° gruppo: C, H, O, N, S	Nella forma di CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , S <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> . Gli ioni sono presenti in soluzione nel suolo mentre i gas provengono dall'atmosfera.	Maggiori costituenti della materia organica, assunti mediante reazioni di ossido-riduzione, e coinvolti in numerosi processi enzimatici.
2° gruppo: P, B, Si	In forma di fosfato, acido borico o borato, acido di silicio.	Essi prendono parte a reazioni di esterificazione con gruppi alcolici. In particolare gli esteri del Fosfato sono coinvolti in reazioni di trasferimento di energia.
3° gruppo: Mg, Mn, Cl, K, Ca, Na.	Presenti in soluzione nel suolo nella loro forma ionica.	Sono responsabili del bilanciamento anionico, del controllo della permeabilità di membrana e del potenziale elettrochimico.
4° gruppo: Fe, Cu, Zn, Mo	Contenuti nel suolo sotto forma di ioni o chelati.	Presenti principalmente nella loro forma chelata in gruppi prostetici. Consentono inoltre il trasporto di elettroni grazie a cambiamenti di valenza.

**Tabella 1.3:** Nutrienti della pianta (Mengel and Kirkby, 2001).

### 1.3-Trasportatori dei metalli

I trasportatori dei metalli all'interno della piante sono delle proteine, appartenenti a specifiche famiglie, che presentano particolarità strutturali tali da consentire il legame, specifico o meno, con i metalli contenuti nel suolo.

Usualmente i trasportatori non legano specificatamente un unico catione divalente ma sono in grado di legare e trasportare con vari gradi di affinità ioni di diversa natura. Una variazione dei livelli intracellulari di più metalli può essere, quindi, determinata dall'incremento o dalla diminuzione di uno specifico trasportatore che può, inoltre, influire sull'espressione di specifici geni target.

Le proteine adibite al trasporto dei metalli si suddividono nelle seguenti classi (Sharma et al., 2013):

1. Antiportatori Cationici
2. ATP Binding Casette (ABC)

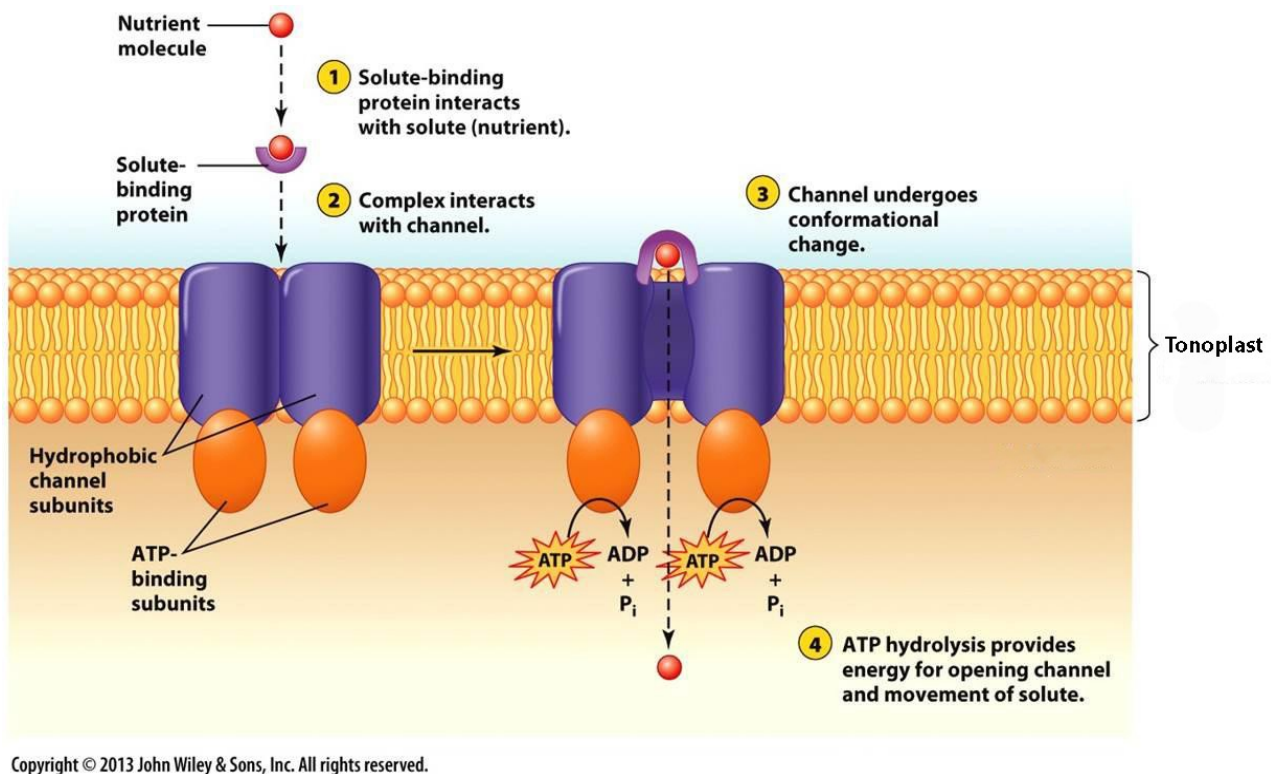
3. Natural Resistance Associated Macrophage Protein (Nramp)
4. Cation Diffusion Facilitator (CDF)
5. ZRT, IRT-like Protein (ZIP)
6. Heavy Metal ATPase (HMA)

Gli antiportatori cationici sono coinvolti nel trasporto attivo attraverso le membrane dei metalli alcalini e alcalino terrosi come sodio e calcio all'interno del vacuolo, di plastidi e di mitocondri sfruttando il gradiente protonico.

Gli ABC sono una superfamiglia che comprende proteine presenti nei batteri, nei funghi, nelle piante e negli animali (Figura 1.1). Nelle piante questi trasportatori sono localizzati nel tonoplasto e sono codificati da geni altamente conservati. Sono suddivisibili in due gruppi: MDRs (multidrug-resistance proteins) e MRPs (multidrug-resistance related proteins).

Le proteine appartenenti a quest'ultima categoria sono caratterizzate da un'unità di base ripetuta due volte costituita da un dominio integrale di membrana (MSD) di 4-6 segmenti ed un dominio di legame per i nucleotidi (NBD) orientato verso il citoplasma.

Questi trasportatori sono in grado di traslocare attivamente ioni, carboidrati, lipidi e peptidi nonché antibiotici e sostanze xenobiotiche. Quelli maggiormente studiati sono responsabili del trasporto di Cd. Sono, inoltre, resi inattivi da sostanze contenenti il Vanadato che, però, non è in grado di entrare nel vacuolo (Martinoia et al., 2001).



**Figura 1.1:** Meccanismo degli ABC transporters (<https://www.studyblue.com/notes/note/n/chapter-2-bacterial-cell-structure-continued/deck/10309546>).

La famiglia di trasportatori che prende il nome di Natural Resistance Associated Macrophage Proteins (Nramps) sono proteine riscontrabili in tutti gli organismi viventi.

Esse sono costituite da 12 eliche transmembrana che presentano un dominio consensus conservato situato tra l'elica 8 e l'elica 9. Le Nramps consentono il trasporto dei cationi metallici bivalenti sia attraverso il plasmalemma che nel vacuolo grazie ad un meccanismo di simporto con ioni  $H^+$  (Nevo Y, Nelson N, 2006).

I Cation Diffusion Facilitator (CDF) sono stati dapprima scoperti nei batteri (Nies, 1992) ed in seguito identificati anche nelle piante, negli animali e nei lieviti (van der Zaal, 1999).

Presentano un lungo dominio citoplasmatico catalitico al C-terminale ed un dominio conservato costituito da 6 eliche transmembrana dotato all' N-terminale di un piccolo peptide segnale.

I principali ligandi per questi trasportatori sono rappresentati da  $Zn^{2+}$  e  $Cd^{2+}$ , che vengono trasportati



dal citoplasma al lume degli organelli intracellulari o all'esterno della cellula.

In *S.cerevisiae* le proteine ZRC1 e COT1 appartenenti a questa famiglia, se sovra espresse, conferiscono rispettivamente resistenza allo zinco/cadmio ed al cobalto (Conklin et al., 1992).

Poiché entrambe sono contenute nella membrana del vacuolo è stato ipotizzato un loro possibile coinvolgimento nei meccanismi di sequestro degli ioni metallici (Li and Kaplan, 1998).

I trasportatori ZIP sono un insieme di proteine responsabile dell'apporto di Zn ed altri metalli, tra cui Cd, Fe e Mn, dal suolo alle radici e, quindi, a diversi tipi di cellule. Si trovano in tutte le classi di organismi viventi e sono generalmente caratterizzati da un'estremità C-terminale ed un'estremità N-terminale collocate nella porzione esterna della membrana citoplasmatica, e da 8 domini elicoidali transmembrana (Guerinot, 2000).

Le Heavy Metals ATPase (HMA) sono una classe di proteine idonee al trasporto di ioni monovalenti, come  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cu}^+$ , e divalenti, quali  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (Hall e Williams, 2003).

Presentano dagli 8 ai 12 domini transmembrana ed un' ampia ansa citoplasmatica, tra i segmenti 4 e 5, all'interno della quale sono contenuti diversi domini conservati che consentono la fosforilazione delle proteine stesse mediante l'utilizzo di una molecola di ATP.

## **1.4- I trasportatori ZIP**

Le “ZIP proteins” sono una famiglia di trasportatori, presenti in tutti gli organismi viventi, che hanno la capacità di traslocare numerosi ioni metallici bivalenti, tra cui  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ed  $\text{Mn}^{2+}$ , all'interno della cellula vegetale.

Grazie alla grande varietà di trasportatori, alla differente affinità con i vari cationi ed alla diversa localizzazione, questa classe di proteine assume un ruolo determinante nella regolazione dell'omeostasi dei metalli nelle piante.

Sono localizzate principalmente nella membrana plasmatica mentre risultano meno presenti sulle membrane degli organelli intracellulari.

Questa famiglia di proteine prende il nome dai primi membri che sono stati identificati: le **Zrt-Proteins** e le **Irt-like Proteins**.

Le prime, rappresentate da Zrt1 e Zrt2, sono state identificate nel lievito *S. cerevisiae* e sono capaci di legare  $\text{Zn}^{2+}$  rispettivamente con bassa ed alta affinità, mentre le seconde sono state osservate in *Arabidopsis thaliana* dove rivestono il ruolo di principali trasportatori di  $\text{Fe}^{2+}$  nelle radici.

Gli ZIP transporter sono osservabili prevalentemente a livello dell'apparato radicale, dove svolgono l'azione di assorbimento dei metalli dal suolo e ne controllano l'entrata all'interno delle cellule della pianta.

Sono espressi costitutivamente ma in situazioni di carenze nutrizionali (in particolare di carenze di Zn), essi vengono up-regolati in modo da aumentare l'influsso dei metalli dal suolo alla cellula (Wintz *et al.*, 2003).

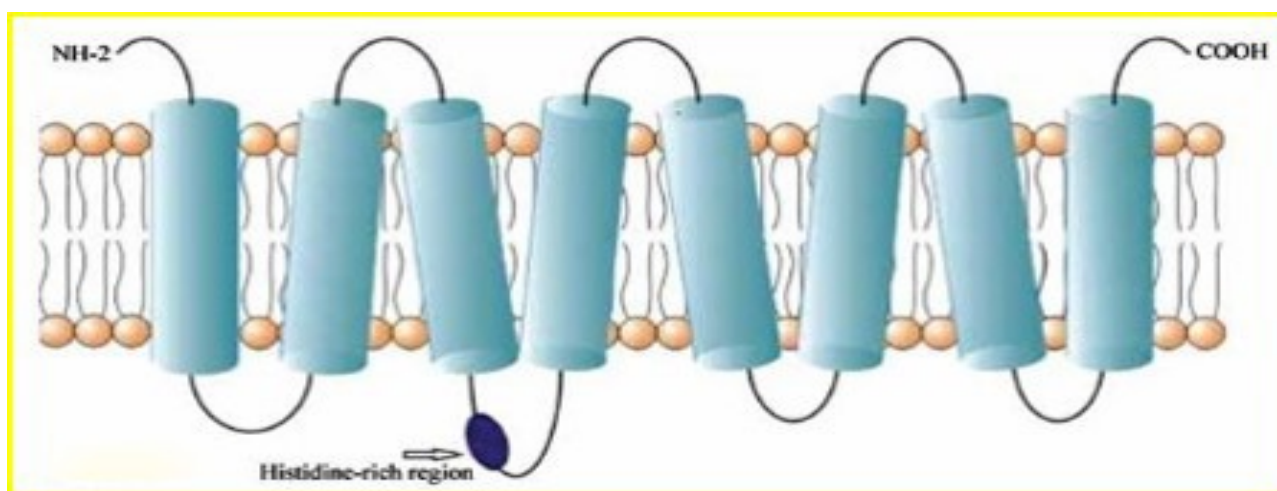
Nel lievito è emerso un controllo dei geni *ZRT1* e *ZRT2* sia al livello trascrizionale che post-trascrizionale. Nel primo caso, in condizioni di carenza di Zn, la risposta dei suddetti geni è regolata dall'attivatore trascrizionale zinco-sensibile *zap1* che lega la sequenza consensus Zinc Responsive Element (ZRE) situata a monte degli stessi facendone aumentare sino a dieci volte la concentrazione cellulare; mentre nel secondo caso, viene attivato da un eccesso di Zn extracellulare che induce una perdita di funzionalità nella proteina ZRT1 causata dalla sua endocitosi cui segue la degradazione nel vacuolo.

Queste proteine sono costituite da una porzione N-terminale e da una C-terminale, entrambe localizzate sulla superficie esterna della membrana plasmatica, e da 8 domini elicoidali transmembrana (Figura 1.2).

Sono dotate, inoltre, di una porzione citoplasmatica che prende il nome di “regione variabile” situata tra l'elica 3 e 4 la quale fa variare la lunghezza di questi trasportatori da 300 a 600 amminoacidi circa.

La porzione maggiormente conservata è situata nel quarto dominio transmembrana ed è costituita

da un'elica anfipatica intramembrana, ricca in istidina (Hys), implicata nel legame e nel trasporto dei metalli (Guerinot, 2000).



**Figura 1.2:** Struttura di una proteina ZIP (Florianczyk e Trojanowski, 2008).

Alcuni esperimenti hanno rilevato che piante in condizioni di carenza di ferro risultano capaci di accumulare cadmio (Cohen et al., 2004).

È stato inoltre dimostrato che, in piante di *Arabidopsis* poste in condizioni di carenza di ferro, la trascrizione della proteina IRT1, appartenente alla famiglia delle proteine ZIP, risulta indotta al livello radicale (Clemens, 2000). Ulteriori studi in lievito hanno provato che IRT 1 presenta un ampio range di specificità di substrato e che, quindi, oltre al  $\text{Fe}^{2+}$  ed allo  $\text{Zn}^{2+}$  è in grado di legare e trasportare anche  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  (Korshunova et al., 1999).

La sostituzione dell'acido glutammico in posizione 103 nella proteina IRT1 wild type del lievito con alanina fa aumentare la compatibilità del trasportatore con vari substrati, tra cui il cadmio, eliminando selettivamente la capacità di quest'ultima di trasportare zinco (Rogers et al., 2000). Infine, piante ingegnerizzate per la sovra espressione di IRT1, sono in grado di accumulare una notevole quantità di Cd rispetto alla loro forma wild type (Guerinot, 2000).

Nel pisello è stato osservato il trasportatore RIT1, che risulta avere una struttura per il 79% simile e per il 69% identica a quella del suo isologo IRT1 (GenBank). Come quest'ultimo viene espresso

nell'apparato radicale in caso di stress da carenza di Fe.

Usando tecniche con traccianti radioattivi è stato possibile osservare che RIT1 è in grado di mediare sia l'assorbimento di zinco e ferro, legandoli con un alto grado di affinità, che l'assorbimento del cadmio, legandolo con un basso grado di affinità (Cohen et al., 1998).

## **1.5- Meccanismi di tolleranza ai metalli**

Le piante, come la maggior parte degli organismi viventi, sono dotate sia di meccanismi che provvedono al mantenimento della corretta concentrazione degli ioni metallici essenziali nei vari compartimenti cellulari, che di meccanismi di difesa verso potenziali danni attuabili da ioni di metalli non essenziali.

Essi garantiscono un corretto spostamento e localizzazione dei metalli sia al livello cellulare che al livello dell'intero organismo, determinando così un valore di base di tolleranza ai metalli stessi.

Le principali strategie di omeostasi dei metalli sono:

- esclusione;
- sequestro;
- riparazione;
- chelazione;
- biotrasformazione;

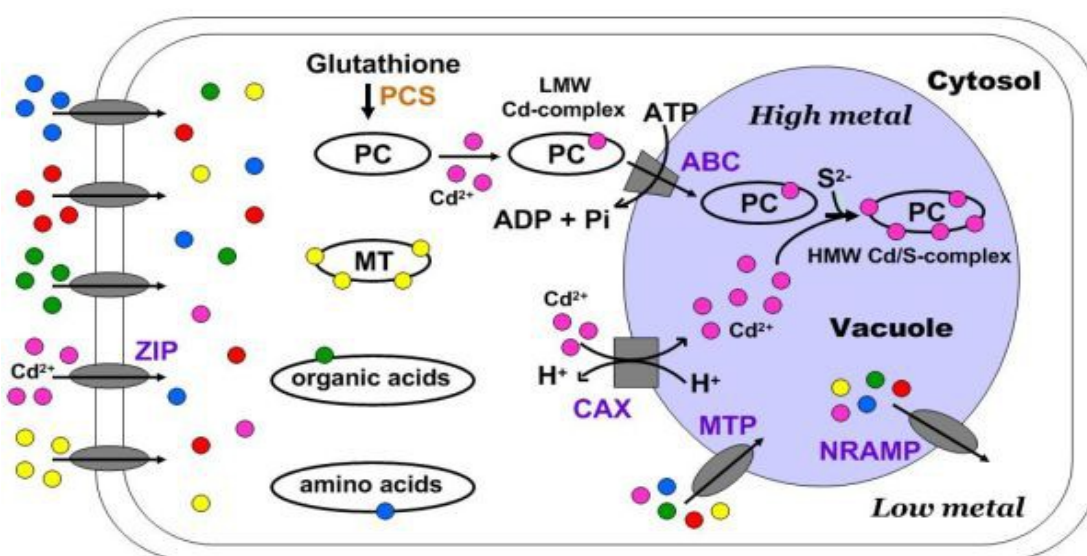
Queste sono possibili grazie alla regolazione dei livelli di espressione di specifiche componenti quali metallotioneine (MT), fitochelatine (PC), amminoacidi, trasportatori, chaperoni molecolari e di acidi organici. Questi fattori, insieme a sistemi antiossidanti sia enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, glutathione perossidasi) che non enzimatici (ascorbato, glutathione), garantiscono la conservazione di un determinato stato di ossidazione che, in condizioni di stress da eccesso di metalli pesanti, può subire modificazioni.

I trasportatori sono responsabili dell'immissione e dell'emissione degli ioni metallici all'interno dell'organismo nonché della loro compartimentalizzazione e traslocazione.

Il processo di esclusione è, nei batteri, il principale meccanismo di tolleranza ed è attuato da pompe ioniche in grado di eliminare i metalli pesanti. Gran parte di questi trasportatori sono codificati da geni appartenenti alla famiglia delle ATPasi CPx. Il sequestro intracellulare, insieme al precedente, è un meccanismo che permette la rimozione degli ioni metallici dal citosol e consente il loro stoccaggio all'interno di compartimenti cellulari specifici (Figura 1.3). Nelle piante il maggiore luogo di storage per le cellule è il vacuolo (Vögeli-Lange e Wagner 1990).

Trasportatori che mediano questo processo sono stati identificati sia in *S.cerevisiae* che in *S.pombe*. Ad essi appartengono le ATPasi di tipologia P, i CDF, le Nramps e la famiglia ZIP. Una volta avvenuto l'uptake i metalli sono legati da agenti chelanti e chaperoni.

La scarsa solubilità e l'elevata reattività degli ioni metallici ne determinano una costante chelazione da parte di trasportatori specifici ed aspecifici. Il processo di chelazione è attuato dagli agenti chelanti che contribuiscono alla detossificazione dei metalli mediante la riduzione della loro concentrazione al livello citosolico. Nelle piante le principali classi di agenti chelanti comprendono le Metallotionine, le Fitochelatine, gli amminoacidi e gli acidi organici.



**Figura 1.3:** Sequestro vacuolare dei metalli pesanti in una cellula vegetale (Yang e Chengcai, 2011).

Le Metallotioneine (MTs), identificate per la prima volta nel grano, sono proteine ubiquitarie a basso peso molecolare (6-7 kDa) ricche di Cisteina che hanno la capacità di legare i metalli in forma ionica promuovendo la formazione di complessi metallo tiolati (Hamer 1986).

Le MT sono state suddivise in due classi in base alla disposizione dei motivi di Cisteina: la MT1, costituita unicamente dal motivo C-X-X-C, e la classe MT2, costituita da diverse combinazioni strutturali quali C-X-C, C-C e C-X-X-C.

Sulla base di queste differenze si è ipotizzata una diversa specificità di legame per i vari metalli (Robinson et al., 1993). Entrambe le classi delle metallotioneine legano prevalentemente lo zinco in forma ionica ( $Zn^{2+}$ ), ma la classe MT1 è in grado di legare anche il Cd formando dei complessi MT1-Cd osservabili sia in cellule di *S. pombe* che di *S. cerevisiae* (Yu et al., 1998).

L'mRNA delle MT è stato rilevato nell'apparato radicale e nei tricomi fogliari, mentre solo MT1 risulta espressa anche al livello del tessuto vascolare e nelle cellule del mesofillo di *Arabidopsis* (Murphy e Taiz, 1995).

L'espressione di questi agenti chelanti risulta specificatamente regolata da diversi apparati durante lo sviluppo delle piante. In particolare la sintesi delle MT viene indotta come risposta a sostanze fitotossiche, shock termici, processi di senescenza e carenze nutrizionali.

Grazie alla presenza ed alla reattività degli atomi N, O ed S al loro interno, gli amminoacidi e gli acidi organici risultano potenziali ligandi per gli ioni metallici. L'ossalato, il malato e l'acido citrico sono implicati in numerosi processi tra cui il trasporto dei metalli attraverso lo xilema, diverse tipologie di tolleranza ai metalli ed il sequestro di questi ultimi all'interno del vacuolo (Rausser, 1999).

L'acido citrico, infatti, è risultato essere il ligando più affine a  $Cd^{2+}$  in condizioni di basse concentrazioni dello ione stesso (Wagner, 1993).

Inoltre, è stato possibile osservare nello xilema di *Brassica juncea*, mediante spettroscopia a raggi-X del legame di  $Cd^{2+}$ , un'interazione di questo ione con gli atomi di N ed O e, nelle radici, un

legame di  $\text{Cd}^{2+}$  con l'atomo di S (Salt et al., 1995).

Le fitochelatine (PCs) sono polipeptidi di piccole dimensioni, ricchi di cisteina, in grado di formare complessi a basso peso molecolare con i metalli al livello citosolico, chelarli e quindi favorirne il sequestro all'interno del vacuolo.

Tutte presentano la medesima struttura generale  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  e sono sintetizzate, a partire dal glutathione (GSH), per via non traduzionale mediante una reazione di transpeptidazione da parte dell'enzima PC-sintasi (Kondo et al., 1984, Grill *et al.*, 1989; Cobbett, 2000).

Un ruolo rilevante per la detossificazione del  $\text{Cd}^{2+}$  è assunto dal complesso PC- $\text{Cd}^{2+}$ . Infatti, piante di *Arabidopsis* mutanti per il gene *cad1*, codificante per la PC-sintasi, risultano ipersensibili al cadmio anche esprimendo livelli normali di glutathione. Il GSH, oltre ad essere il precursore delle PC nella via metabolica di produzione, ricopre insieme all'acido ascorbico anche un importante ruolo di antiossidante nel processo di detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che ha luogo nei cloroplasti delle piante sottoposte a condizioni di stress ossidativo.

Gli chaperoni sono invece molecole essenziali per la collocazione degli specifici cofattori metallici sui rispettivi enzimi coinvolti nello smaltimento dei ROS (es. superossido dismutasi -SOD- ), nella sintesi e nella degradazione proteica.

Il processo di biotrasformazione, infine, implica la conversione di un composto xenobiotico in una sostanza chimica idrosolubile da parte degli enzimi contenuti all'interno di un organismo vivente (A Prakinson, 2006). In particolare, cellule di piante in coltura possono essere utilizzate per trasformare molecole organiche in composti organici più utili mediante reazioni di idrolisi, ossidazione, riduzione, esterificazione, isomerizzazione e glicosilazione (Ishihara et al. 2003).

## 1.6- Inquinamento

I metalli di transizione quali Cd, Pb, Hg, As e Sn sono sostanze inquinanti, derivate sia da processi naturali che da numerose attività antropiche come trattamenti delle colture con fungicidi e pesticidi,

produzione di acque di scarico da parte delle industrie agricole e non, uso di fertilizzanti, attività minerarie, produzione di rifiuti domestici e trattamento delle piante con acque di scolo, che hanno influenzato in maniera sempre più significativa i vari ecosistemi. (Mcfarlane and Burchett, 2001).

I metalli suddetti possono essere introdotti nell'ambiente anche sotto forma di gas atmosferici che vengono dislocati, dai venti, dalla loro fonte di origine prima di essere depositati sul terreno o in acqua. Nonostante alcuni di questi metalli svolgano un ruolo rilevante nella fisiologia della pianta, molti possono risultare tossici se in concentrazioni superiori alla soglia ottimale.

Tecniche fisico-chimiche per la decontaminazione di suoli inquinati quali l'immobilizzazione e l'estrazione risultano essere eccessivamente costose e spesso adatte solo al risanamento di aree ristrette in cui è richiesta una completa decontaminazione in tempi brevi.

Altre tecniche, come il soil washing e l'estrazione di vapore, provocano invece degli effetti negativi sulla struttura e fertilità del suolo e sull'attività biologica degli organismi, oltre ad avere elevati costi di realizzazione (Martin and Bardos, 1996; BIO-WISE, 2000).

L'immobilizzazione, in particolare, può ridurre la percentuale di metalli pesanti o cambiarne lo stato di ossidazione e, quindi, diminuirne la biodisponibilità e la mobilità nel terreno (Peng et al., 2009).

Alcuni aspetti negativi di questa metodologia di risanamento includono l'assorbimento di sostanze chimiche nocive, un eccessivo scambio ionico, la formazione di complessi stabili con substrati organici e reazioni di ossido-riduzione anomale.

Come l'immobilizzazione anche l'estrazione di vapore dal suolo può provocare numerosi effetti negativi sul terreno trattato.

Tra questi vi sono il flusso irregolare di gas dalle regioni contaminate, i danni a persone ed all'ambiente provocati dall'aria di scarico che, perciò, richiede trattamenti specifici, e la produzione di liquidi residui che devono essere eliminati. Inoltre, il carbone attivo esaurito da questa tecnica richiederà del tempo per la sua rigenerazione (<http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4-7.html>).

Negli ultimi anni il fitorisanamento è stato considerato come un'importante tecnologia, a basso



costo e visivamente discreta, atta al risanamento del sito trattato mediante la sua parziale decontaminazione, la conservazione delle attività biologiche degli organismi in esso contenuti, il mantenimento della struttura fisica del suolo e la possibilità di biorecovery dei metalli ( Baker et al., 1991, 1994).

## 1.7- Fitorisanamento

Il fitorisanamento o Phytoremediation (dal greco “*phiton*”, pianta) è definibile come “ *the use of plants to remove pollutants from the environment or to render them harmless*” (Salt et al., 1998) ed ha avuto origine in seguito al rinvenimento di specie vegetali cresciute in suoli naturalmente ricchi di metalli pesanti. (Rock e Sayre, 2000).

Si tratta di una tecnica nota da più di dieci anni sia in America che in Europa, tutt'ora oggetto di studio ed in via di sviluppo.

Le sostanze target di questo processo sono metalli (Pb, Zn, Cd, Cu, Ni, Hg), metalloidi (As, Sb), composti inorganici ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), elementi chimici radioattivi (U, Cs, Sr), idrocarburi e derivati del petrolio (BTEX), pesticidi ed erbicidi (atrazina, bentazone, composti clorinati e nitroaromatici), esplosivi (TNT, DNT), solventi clorurati (TCE, PCE) e scarti organici industriali (PCP, PAH) (Favas et al., 2014).

Oltre ad essere una tecnologia a basso costo, tra i suoi vantaggi sono da evidenziare il rispetto della struttura fisico-chimica del suolo, il mancato utilizzo di sostanze chimiche e di macchinari che vengono sostituiti da organismi viventi, l'assenza di impatto ambientale visivo, il rispetto di flora e fauna del sito trattato, la possibilità di applicazione su lungo periodo, l'opportunità di creare lavoro qualificato, poiché richiede mano d'opera specializzata, nonché la produzione di biomassa.

Non possono tacersi gli svantaggi che presenta questo trattamento da individuarsi nella durata, spesso pluriennale, che ne impedisce l'applicazione in casi in cui si ha la necessità di riutilizzo del terreno in tempi brevi, e nell'inefficacia in caso di alti livelli di inquinamento del sito stesso.

Le specie vegetali ideali per questo trattamento risulterebbero quindi piante dotate di un sistema radicale che va in profondità, in grado di tollerare ed accumulare le sostanze inquinanti di interesse, dotate di un veloce tasso di crescita, capaci di produrre un'elevata quantità di biomassa ed adatte a crescere in terreni poveri di nutrienti (Punshon et al., 1996).

In principio le piante definite come “iperaccumulatrici” furono quelle maggiormente impiegate grazie alla loro capacità di immagazzinare, nelle parti aeree, sostanze potenzialmente fitotossiche in concentrazioni sino a 100 volte maggiori rispetto alle piante “non accumulatrici” senza soffrire eccessivamente della loro tossicità (Salt et al., 1998).

In particolare, i metalli venivano maggiormente concentrati nei tessuti radicali delle piante iperaccumulatrici, facendo così supporre che questo meccanismo svolgesse un ruolo di natura protettiva contro agenti esogeni come funghi, insetti ed altri microrganismi (Chaney et al., 1997).

Inoltre, è stato osservato che nelle piante iperaccumulatrici gli antiportatori cationici, insieme ai trasportatori ABC, svolgono un ruolo importantissimo grazie alla loro localizzazione nella membrana vacuolare e consentono la compartimentalizzazione dei complessi fitochelatina-metallo (Schneider et al., 2009).

Esempi includono varie specie della famiglia delle *Brassicaceae*: *Thlaspi*, che può accumulare nei germogli più del 3% in Zn, 0,5% in Pb e 0,1% in Cd del loro peso secco; *Alyssum* ed alcune sue specie che sono in grado di immagazzinare più dell'1% del loro peso secco in Ni (Brooks et al., 1979). Il loro utilizzo si è dimostrato però molto limitato poiché caratterizzate da crescita lenta e bassa resa in termini di biomassa.

In alternativa, sono state proposte delle piante non accumulatrici poste in terreni manipolati in modo tale da rendere più disponibile il metallo di interesse e quindi facilitarne l'assorbimento.

Ne è un esempio l'aumento della disponibilità degli ioni Pb e Cr in soluzione nel terreno in seguito al trattamento con l'agente chimico EDTA che esercita su di essi un'azione di tipo chelante (Cooper et al., 1999).

Un ulteriore modo per migliorare la fitoestrazione da parte di piante non accumulatrici è stata la modificazione dei meccanismi di resistenza ai metalli mediante incroci programmati e manipolazione genetica (Salt et al., 1998).

Ultimamente è stata presa in considerazione l'idea di utilizzare gli alberi per il fitorisanamento. Molti alberi non sono in grado di adattarsi ad elevate concentrazioni di metalli pesanti poiché presentano una rilevante riduzione del tasso di crescita in condizioni a causa dello stress ossidativo indotto da metalli (Dickinson et al., 1992). Possono quindi essere adatti per suoli non eccessivamente inquinati che necessitano di una stabilizzazione a lunga durata.

La biodisponibilità dei metalli per gli alberi ed il conseguente accumulo nei tessuti è estremamente variabile e può dipendere sia dalle condizioni del sito in questione che dalla fonte di contaminazione.

Di notevole interesse è la famiglia delle *Salicaceae* a cui appartengono varie specie ed ibridi di salice e pioppo che presentano un'elevata variabilità genetica e molteplici caratteri adattativi. Numerosi studi hanno osservato un accumulo di metalli all'interno dei tessuti che crescono attivamente come i germogli e le foglie.

Ne sono un esempio particolari cloni di pioppo coltivati su specifici terreni inquinati con fanghi di depurazione che presentano maggiori concentrazioni di Zn e Cd nei tessuti fogliari rispetto ai controlli (Drew et al., 1987).

Oltre ai germogli ed alle foglie, il legno e la corteccia sono organi disponibili per il deposito dei metalli e costituiscono una biomassa in rapido accrescimento.

Questi possono immobilizzare i metalli per un periodo di tempo relativamente lungo in scompartimenti inattivi dal punto di vista metabolico e risultano essere tessuti che entrano lentamente nel ciclo di decomposizione (Lepp, 1996).

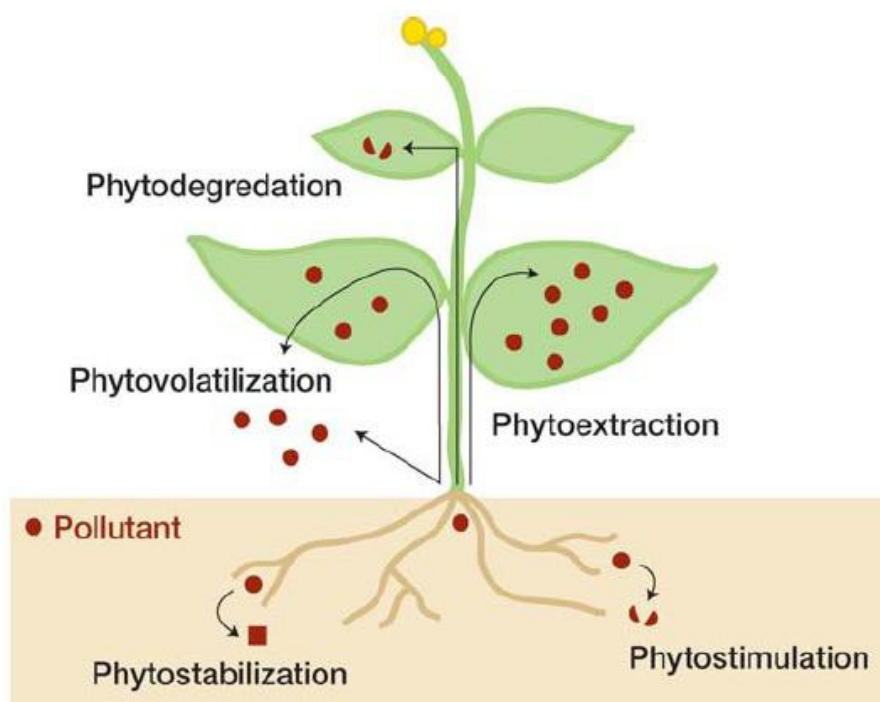
La Fitodepurazione può avere luogo mediante l'utilizzo delle seguenti strategie (figura 1.4):

1. Fitodegradazione: piante e microrganismi associati che degradano le sostanze inquinanti

(Burken e Schnoor, 1997);

2. Fitovolatilizzazione: inquinanti resi volatili dalle piante e rilasciati nell'atmosfera (Burker e Schnoor, 1999; Banuelos et al., 1997);
3. Fitostabilizzazione: le piante riducono la mobilità e la biodisponibilità delle sostanze inquinanti nell'area trattata mediante immobilizzazione o prevenzione della migrazione (Vangronsveld et al., 1995; Smith e Bradshaw, 1972);
4. Rizofiltrazione: le radici delle piante assorbono metalli da reflussi di acque inquinate (Dushenkov et al., 1995);
5. Fitoestrazione: alcune piante sono in grado di assimilare sostanze inorganiche dal suolo e concentrarle in specifici compartimenti (Kumar et al., 1995).

Questo processo coinvolge dapprima l'apparato radicale, responsabile dell'assorbimento di radionuclidi e metalli, seguito dallo xilema, deputato al trasporto delle sostanze in questione sino ai siti di stoccaggio. La successiva rimozione della biomassa vegetale implica l'eliminazione conclusiva della sostanza inquinata dal sistema.



**Figura 1.4:** Fitodepurazione (<http://www.igece.org/WRKY/BrachyWRKY/WRKY/Phytoremediation.html>).

## 1.8- Definizione di Metalli Pesanti

I metalli pesanti sono un gruppo di elementi che sono associati a contaminazioni e ritenuti responsabili di effetti tossici per gli organismi viventi.

La prima definizione fu data da Bjerrum nel 1936 che classificò come “pesanti” quei metalli aventi una densità maggiore di  $7 \text{ g/cm}^3$ .

Nel corso degli anni questa soglia è stata modificata da numerosi Autori sino a giungere, nel 1989 con Parker, nel 1991 con Lozet e Mathieu, e nel 1992 con Morris, ad una densità maggiore di  $5 \text{ g/cm}^3$ .

Decaduta la definizione suddetta a causa della scarsa relazione tra densità e reattività dal metallo essa fu rinnovata prendendo come riferimento il peso atomico degli elementi in questione.

In particolare; Bennet nel 1986 e Lewis nel 1993, scelsero un peso atomico maggiore di quello del Sodio (equivalente a 23) mentre Rand et al., nel 1995, preferirono metalli dal peso atomico maggiore di 40. Un'ulteriore definizione fu data sulla base del numero atomico da Lyman nel 1995, che limitò i metalli pesanti a quegli elementi con un numero atomico superiore a 20.

Tutt'ora non è stato raggiunto un accordo riguardo ad una definizione univoca per l'espressione “metalli pesanti”.

È perciò possibile utilizzare i seguenti criteri di classificazione per determinare se un metallo appartiene a questa classe o meno (Duffus, 2002):

1. definizione in termini di densità:  $3,5 < d < 7 \text{ g/cm}^3$ ;
2. definizione in termini di numero atomico:  $n > 23$  o elemento appartenente ai metalli di transizione;
3. definizione in termini di peso atomico: peso atomico maggiore di 20;
4. definizione basata su proprietà fisiche e chimiche: alto peso molecolare, elevata capacità di formare saponi e leghe metalliche molto dense;
5. definizione basata sulla tossicità: derivati da processi industriali, spesso tossici per animali e

per processi aerobici ed anaerobici;

6. definizione non chimica usata prima del 1936.

## 1.9- Il Cadmio

Il Cadmio è un elemento che fa parte del Gruppo IIB (accettori di elettroni di piccola grandezza e con bassa polarizzabilità) dei metalli di transizione. Essi devono il loro nome al fatto che sono collocati tra gli elementi del blocco “p” e quelli del blocco “s” (Figura 1.5).

**Tavola Periodica degli Elementi**

**Legenda:**

- Metalli Alcalini
- Metalli Alcalino-Terrosi
- Lantanidi
- Attinidi
- Elementi di Transizione
- Metalloidi / Non Metalli
- Alogeni
- Gas Nobili

**Stati Fisici:**

- SOLIDI
- LIQUIDI
- GASSOSI
- ARTIFICIALI

**Dettagli dell'Idrogeno (H):**

- Numero Atomico: 1
- Peso Atomico: 1,0079
- Valenza: 1
- Densità (g/cm³): 0,00008989
- Temp. Fusione (°C): -252,87
- Temp. Ebollizione (°C): -252,87
- Simbolo: H
- Nome: Idrogeno

**Lantanidi:** Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu

**Attinidi:** Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr

Figura 1.5 Tavola periodica ([http://www.tuttochimica.altervista.org/tavola\\_periodica.html](http://www.tuttochimica.altervista.org/tavola_periodica.html)).

Il Cd ha numero atomico 48, densità di 8,69 g/cm<sup>3</sup>, massa atomica di 112,411 g/mol e presenta configurazione elettronica [Kr]4d<sup>10</sup>5s<sup>2</sup>.

È un metallo dal colore bianco-argento, duttile, elettropositivo, con temperatura di ebollizione di 767°C, temperatura di fusione pari a 321°C e che possiede otto isotopi stabili: 106Cd (1,22%),

$^{108}\text{Cd}$  (0,88%),  $^{110}\text{Cd}$  (12,39%),  $^{111}\text{Cd}$  (12,75%),  $^{112}\text{Cd}$  (24,07%),  $^{113}\text{Cd}$  ( 12,26%),  $^{114}\text{Cd}$  (28,86%),  $^{116}\text{Cd}$  (7,58%).

Come lo Zinco, è caratterizzato dall'avere l'orbitale “d” completo e si presenta quasi sempre in forma bivalente nei composti stabili. Tra questi ultimi il più comune in natura è il solfuro di Cadmio ( $\text{CdS}$ ) che può reagire con ammoniaca e cianuro a formare  $\text{Cd}(\text{NH}_3)_6^{4-}$  e  $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$ .

Esso può reagire con l'ossigeno atmosferico a temperatura ambiente a formare ossido di Cadmio, mentre non è in grado di combinarsi con l'acqua. Può formare inoltre vari complessi con ammine, zolfo, cloro e chelati e, in forma ionica, con fosfati, ossalati, arseniati e carbonati.

Può inoltre dare luogo a composti insolubili di colore bianco, solitamente in forma idratata. (Adriano, 2001). Gran parte di esso è ottenuto come sottoprodotto dalla mineralizzazione e dalla raffinazione dello Zinco.

## **1.10- Effetti dello stress da Cadmio**

Il Cd è stato scoperto nel 1817 dal fisico Friedrich Stromeyer mentre effettuava dei test di tossicità su alcuni medicinali contenenti ossido di zinco (Krebs, 2006).

Il cadmio è ritenuto uno degli inquinanti maggiormente rilevanti poiché presenta sia un'alta solubilità in acqua sia un evidente effetto tossico su piante ed animali (Pinto et al., 2004).

Il Cd è introdotto nell'ambiente a causa del traffico urbano, dell'uso di fertilizzanti fosfati, dell'estrazione di minerali contenenti Zn e Pb, degli impianti di riscaldamento e dei processi industriali (Rauser and Muwly, 1995).

La sua concentrazione nel terreno di vari paesi Europei è aumentata molto nel corso degli anni sino ad arrivare ad un +43% rispetto ai dati raccolti circa 100 anni fa (UNEP, 2000).

Un suolo non contaminato presenta dei livelli di Cd compresi tra 0,04 e 0,32 mM mentre suoli aventi concentrazioni comprese tra 0,32 ed 1 mM sono considerati moderatamente inquinati (Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999).

Le difese antiossidanti contro il Cd comprendono l'attività di enzimi, quali la glutatione perossidasi (GPX), la catalasi (CAT), l'ascorbato perossidasi (APX), la superossido dismutasi (SOD) e la glutatione S-trasferasi (GST).

Sono inoltre implicate in questo processo molecole liposolubili associate alla membrana, come la xantofille, il tocoferolo ed il  $\beta$ -carotene, nonché agenti riducenti idrosolubili quali il glutatione e l'acido ascorbico (Azevedo et al., 2012; Ahmed et al., 2010).

I principali effetti che presentano gli organismi vegetali esposti ad elevate concentrazioni di cadmio sono:

- inibizione della crescita;
- alterazione dell'attività enzimatica e di fotosintesi: inibizione della biosintesi della clorofilla;
- clorosi che può manifestarsi per mancanza di Fe (causata dall'inibizione della Fe(III)-reduttasi) riduzione del trasporto di Mn e carenza di P;
- riduzione dell'assorbimento di acqua (Haghiri, 1973);
- diminuzione dell'assorbimento di nutrienti dovuta sia all'alterazione della disponibilità di questi ultimi nel suolo sia alla riduzione della popolazione microbica (Moreno et al., 1999);
- particolare riduzione dell'assimilazione del nitrato causata dall'inibizione dell'attività della nitrato reduttasi nel germoglio (Hernandez et al., 1996);
- alterazione nella funzionalità della membrana citoplasmatica provocata dalla perossidazione dei lipidi (Fodor et al., 1995);
- riduzione dell'attività enzimatica delle proteine coinvolte nel processo di fissazione della CO<sub>2</sub> (Stobart et al., 1985);
- produzione di specie reattive dell'ossigeno in seguito alla diminuzione di antiossidanti sia di natura proteica che di diversa natura (Stohs e Bagchi, 1995; Shaw, 1995; Gallego et al., 1996; Sandalio et al., 2001).

Un esempio è costituito dagli enzimi antiossidanti SOD, CAT, APOX, glutatione reduttasi



(GR) e deidroascorbato reduttasi (DHAR) di *Helianthus annuus* che presentano, insieme al GSH, una diminuzione significativa in base alla concentrazione di cadmio nel terreno, all'organo in cui sono localizzati ed all'età della pianta (Gallego et al., 1999; Gropa et al., 2001).

La possibilità delle piante di assorbire il Cd dipende dalla sua concentrazione nel terreno e dalla sua biodisponibilità.

Queste due componenti sono determinate dalla concentrazione degli altri elementi del suolo, dal pH, dalla presenza di materiale organico e dal potenziale di ossido-riduzione.

L'assorbimento del Cd sembra essere in competizione con quello di nutrienti come K, Zn, Ni, Cu, Ca, Fe, Mg poiché implica l'uso delle stesse proteine carrier transmembrana (Clarkson e Luttge, 1989).

Il Cd entra facilmente nelle radici al livello del tessuto corticale, dove provoca i primi danni, viene quindi legato da ligandi come acidi organici e fitochelatine e trasportato allo xilema sia attraverso vie sinplastiche che apoplastiche (Senden et al., 1992; Salt et al., 1995).

Il Cd può entrare nel citoplasma delle cellule vegetali grazie all'azione di trasportatori cationici non selettivi, ne sono un esempio i trasportatori per il Ca e Na.

Il contenuto di Cd nelle piante risulta decrescere con il seguente ordine nei vari organi: radici, steli, foglie, frutti e semi (Blum, 1997). In *Arabidopsis halleri* il Cd, come lo Zn, è stato riscontrato a livello delle porzioni aeree della pianta (Bert et al., 2003), suggerendo così una correlazione nell'assorbimento e nel trasporto di questi due ioni dovuta probabilmente o all'utilizzo dei medesimi trasportatori o all'azione di regolatori comuni su trasportatori diversi.

Ne è un esempio il trasportatore ZNT1 ad alta affinità per lo Zn che può anche attuare il trasporto di Cd nonostante la bassa affinità (Lasat et al., 2000).

Un ulteriore esempio di un trasportatore coinvolto nell'assorbimento dei metalli in *Arabidopsis* è

rappresentato da AtNramp3, anch'esso implicato nell'attività di trasporto di  $\text{Cd}^{2+}$  (Thomine et al., 2000).

## 1.11- Il Pioppo

Le specie di *Populus* sono piante di natura arborea appartenenti alla famiglia delle *Salicaceae*. Queste presentano un elevato tasso di accrescimento, un apparato radicale capace di estendersi in profondità e la capacità di crescere in aree esposte a contaminanti e povere di sostanze nutrienti. (Di Lonardo et al., 2010).

I pioppi, il cui genoma è stato interamente sequenziato (Tuskan et al., 2006), hanno la prerogativa di poter essere propagati facilmente mediante tecniche *in vitro*, oltre ad essere ampiamente utilizzati in incroci mirati al miglioramento genetico ed a processi di ingegneria genetica al fine di ottenere piante transgeniche (Confalonieri et al., 2003).

Per la grandezza del suo genoma, la conseguente facilità di trasformazione e propagazione, per le sue caratteristiche morfologiche, per la capacità di accumulo dei metalli pesanti e per la crescita in terreni contaminati e non, il pioppo è stato preso come organismo modello per lo studio dei processi fisiologici e molecolari che sono attuati dalle specie arboree in risposta all'esposizione a metalli pesanti.

Il pioppo è una piante decidua in grado di assorbire sostanze inquinanti (Cd, Zn, Mn, Cu) ed immagazzinarle, in seguito a traslocazione, al livello fogliare.

Le foglie costituiscono, quindi, i siti di storage dei metalli in eccesso, la cui concentrazione aumenta durante il processo di crescita sino ad arrivare ad un picco massimo durante il periodo autunnale. Questo è la principale causa della prematura senescenza fogliare e della caduta anticipata delle foglie stesse (Letten et al., 2011).

Nei tessuti radicali l'endoderma svolge sia il ruolo di barriera protettiva che quello di filtro per i metalli assorbiti dalla radice stessa, limitandone il trasferimento nei vasi.

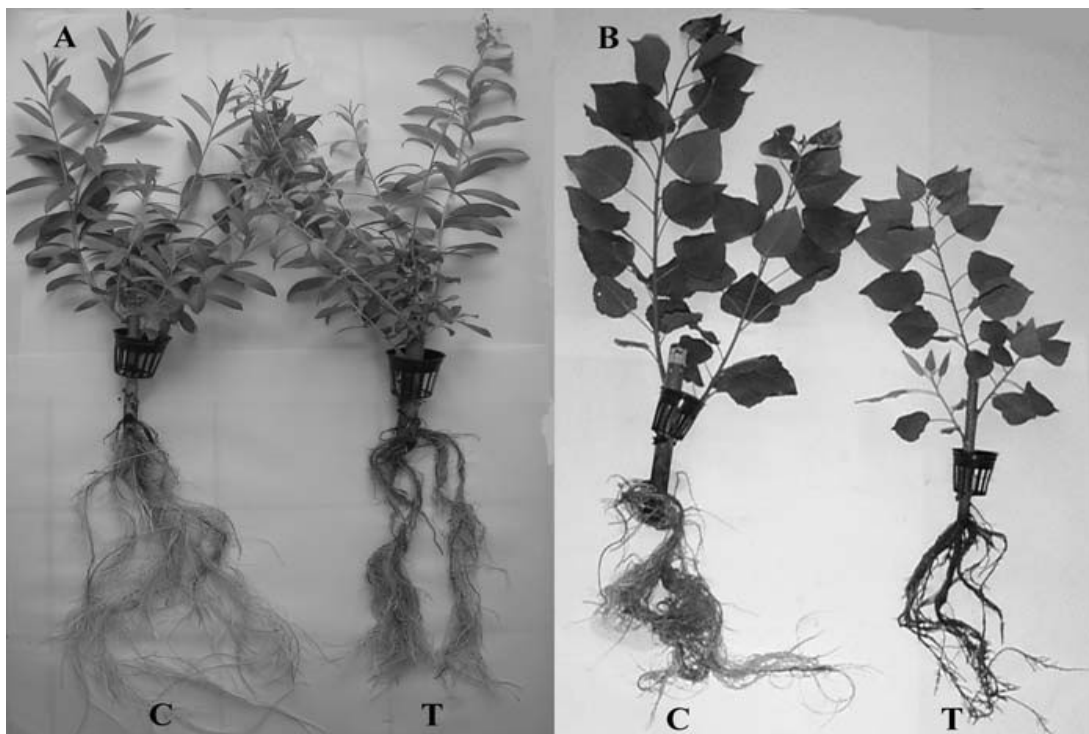
## 1.12- Effetti del Cadmio sul Pioppo

Al fine di valutare la capacità di fitorisanamento del pioppo è stata condotta una sperimentazione (Zacchini et al., 2008), in coltura idroponica, che aveva come oggetto lo studio della tolleranza di quest'ultimo al Cd e delle sue capacità di accumulazione e traslocazione.

I cloni di pioppo, rispetto a quelli di salice, hanno mostrato un'enorme variabilità nella distribuzione ed accumulazione del cadmio.

Effetti causati dal Cd sono stati rinvenuti in tutti i tessuti delle piante fatta eccezione per le radici dove non è stato riscontrato un cambiamento di numerosità.

Non sono stati rilevati sintomi di clorosi in nessuna delle due specie. Nel salice, al contrario del pioppo, la crescita del fusto e delle radici non sembrava risentire dell'esposizione al cadmio (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** aspetti morfologici di piante di salice (A) e pioppo (B) esposte a concentrazioni di solfato di cadmio pari a 50  $\mu$ M (T) paragonati con quelli di piante di controllo. (Zacchini et al., 2008).

I valori medi di ogni clone delle due specie di *Salicaceae* hanno mostrato che il salice presenta una maggiore tolleranza ( $Ti = \text{peso secco della pianta trattata con Cd} / \text{peso secco della pianta di controllo} \times 100$ ) nonché una capacità pressoché doppia di traslocazione del Cd. Per quanto riguarda invece la concentrazione di  $\text{Cd}^{2+}$ , essa è risultata maggiore in tutti i cloni di pioppo rispetto a quelli di salice. I dati riportati fanno del pioppo e del salice dei buoni candidati per il fitorisanamento di terreni contaminati.

Queste due specie di *Salicaceae* potrebbero essere impiegate, viste le diverse proprietà osservate, in differenti strategie di fitorisanamento: da una parte il pioppo, capace di accumulare il Cd al livello dell'apparato radicale, potrebbe essere usato per la rizofiltrazione o per limitare l'efflusso di metalli nell'acqua in siti contaminati (phytostabilization); dall'altra il salice, in grado di traslocare e concentrare il Cd in parti aeree che tollerano i metalli, potrebbe essere impiegato in strategie come la fitoestrazione (Zacchini et al., 2008).

Un ulteriore studio (Lettens et al., 2011), atto alla valutazione della risposta del pioppo alla presenza di agenti contaminanti nel suolo e nello specifico al Cd, ha analizzato la variazione intra- ed inter-annuale della concentrazione di Cd, Zn, Mn, e Cu nelle foglie della pianta.

All'interno di ogni singola stagione di crescita è stato possibile osservare, nelle foglie di alberi posti per la prima volta nel terreno inquinato, un aumento della concentrazione di Cd, Cu, Zn all'inizio ed alla fine della stagione. Anche le piante poste nel sito non contaminato hanno mostrato un aumento della concentrazione fogliare di Cu, Cd e Zn con le medesime tempistiche, mentre, le piante collocate da dieci anni su suolo inquinato, non hanno mostrato variazioni nella concentrazione degli ioni metallici nel corso dell'anno (Lettens et al., 2011).

Nel corso degli anni, gli alberi che erano stati posti per la prima volta all'interno del terreno inquinato hanno mostrato una diminuzione della concentrazione fogliare di Cd, Zn ed Mn ed un incremento della biomassa, mentre, i pioppi presenti da anni su suolo inquinato, anche in questo caso, non hanno mostrato variazioni nella concentrazione degli ioni metallici nelle foglie.

Questo studio prova, quindi, che numerosi meccanismi possono influenzare la concentrazione di metalli all'interno delle foglie di giovani piante di pioppo. Tra essi vi sono la diminuzione del tasso di respirazione e la ridotta capacità di assorbimento dei metalli presenti in soluzione nel suolo (Lettens et al., 2011).

### **1.13- Scopo della tesi**

Il fine di questa tesi è stato il clonaggio del gene codificante per la proteina ZIP9 di *Populus x euroamericana* clone I-214, lo studio di espressione in condizioni di stress da Cd e l'analisi di una sua eventuale azione compartimento-specifica mediante la localizzazione subcellulare.

La proteina in questione è stata presa in considerazione poiché, in un precedente studio, è risultata sovra espressa a livello delle radici in condizioni di stress da Zn (Ariani A et al., 2015).

A tale scopo, la proteina ZIP9 è stata clonata *in frame* con la proteina fluorescente YFP e messa sotto il controllo del promotore 35S per formare un costrutto con cui trasformare i protoplasti di *Arabidopsis*. Infine, per valutare una possibile risposta del gene *zip9* a stress da Cd, sono state effettuate RT-qPCR su cDNA di *Populus alba* prodotto da piante cresciute in terreni a concentrazione crescente di Cd, rispettivamente pari a 0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M.

## Materiali e Metodi

### 2.1 Clonaggio del gene *zip9* da cDNA di *P. x euroamericana* clone I-214

Il gene *zip9* è stato clonato a partire dal cDNA di *P. euroamericana* clone I-214 per mezzo di una PCR High Fidelity usando come primers Zip9 forward e Zip9 reverse (Tabella 2.1).

Le sequenze Zip9 forward e Zip9 reverse sono state disegnate su una porzione di sequenza conservata, gli ampliconi dei geni appartenenti a questo gruppo, inoltre, presentano la stessa lunghezza in nucleotidi.

Primer		Sequenza
ZIP9	forward	5'-ATGCCTTGTTTGAAAATCCCA-3'
ZIP9	reverse	5'-TCAATCCCAAATCATAACAACACTGCA-3'

**Tabella 2.1:** sequenze dei primer ZIP9.

Il processo è stato realizzato usando il kit “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (New England BioLabs), procedendo secondo il protocollo standard suggerito dalla ditta produttrice.

La reazione è stata effettuata nelle seguenti condizioni:

- denaturazione iniziale a 98 °C per 2 minuti
- denaturazione a 98 °C per 10 secondi
- annealing a 58 °C per 30 secondi
- estensione a 72 °C per 20 secondi
- per 35 cicli
- fine reazione a 72 °C per 5 minuti.

Una volta giunta a termine la reazione, ad un'aliquota del prodotto di PCR pari a 5µl, è stato aggiunto 1µl di Loading buffer (6 X) (tabella 2.2) . L'amplificazione ottenuta è stata poi osservata su gel di agarosio all'1% con bromuro di etidio (EtBr), avente concentrazione pari a 10 mg/ml, mediante una corsa elettroforetica condotta a 100 V nella soluzione tampone TBE (0,5 X) (tabella2.3).

Loading buffer 6 X	
Reagente	Concentrazione (v/v)
Glicerolo	30,00%
Blu di bromofenolo	0,25%

**Tabella 2.2:** composizione del Loading buffer 6 X.

Tampone TBE 5 X	
Reagente	Concentrazione
Tris	5,4% (w/v)
Acido borico	2,75% (w/v)
EDTA 0,5M pH8	2%(v/v)

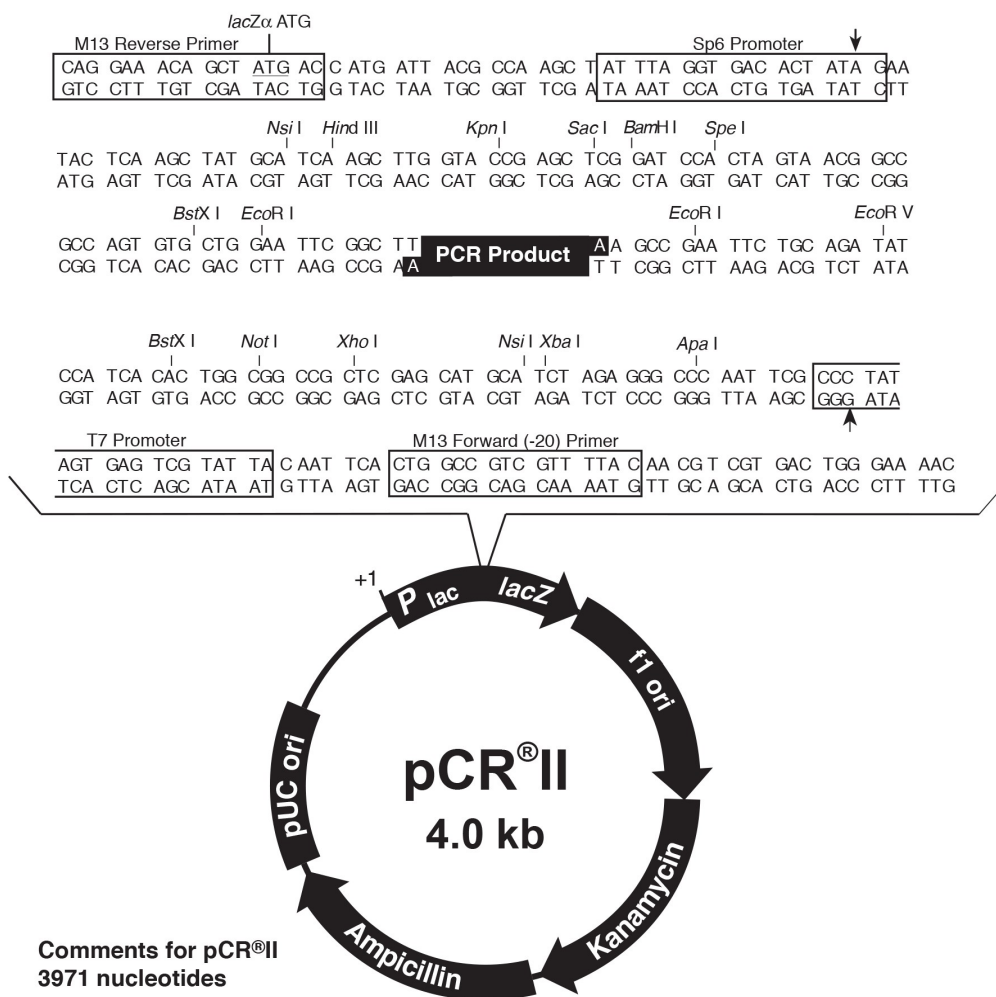
**Tabella 2.3:** composizione del tampone di corsa per elettroforesi TBE 5 X.

Dopo aver verificato che la reazione di amplificazione fosse avvenuta correttamente il prodotto di PCR rimanente, pari a 45  $\mu$ l, è stato purificato per mezzo del kit “Nucleo Spin Gel PCR Cleanup” (Macherey-Nagel) eseguendo il protocollo indicato dal produttore.

In seguito, è stata fatta una reazione di A-Tailing al fine di attaccare all'estremità 3' del prodotto di PCR una deossiadenina.

Quest'ultima reazione è essenziale poiché consente, mediante ligation, di legare in modo funzionale l'inserito con il vettore plasmidico pCRII (Invitrogen) in forma linearizzata che, all'estremità 3', è dotato di una deossitimidina sporgente.

Il pCRII presenta in aggiunta i geni per la resistenza agli antibiotici kanamicina ed ampicillina ed il gene lacZ che codifica per la subunità “a” della proteina  $\beta$ -galattosidasi necessaria per lo screening bianco-blu delle cellule di *E.coli* (Figura 2.1).



**Comments for pCR<sup>®</sup>II**  
**3971 nucleotides**

LacZ $\alpha$  gene: bases 1-587  
 M13 Reverse priming site: bases 205-221  
 Sp6 promoter: bases 239-256  
 T7 promoter: bases 404-423  
 M13 (-20) Forward priming site: bases 431-446  
 f1 origin: bases 588-1025  
 Kanamycin resistance ORF: bases 1359-2153  
 Ampicillin resistance ORF: bases 2171-3031  
 pUC origin: bases 3176-3849



**Figura 2.1:** Vettore plasmidico pCR<sup>®</sup>II del kit “Dual Promoter (pCR<sup>®</sup>II) per TA Cloning” (Invitrogen).



La reazione di A-Tailing è stata realizzata in un volume finale pari a 10 µl usando:

- 7µl di prodotto di PCR purificato
- 1µl di Taq Buffer (10 X)
- 0,5 µl di MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 0,5 µl di Taq
- 1µl di dATP (2 mM).

Il mix di reazione è stato messo in incubazione a 70°C per 30 minuti.

Il restante prodotto, purificato dalla reazione di PCR, è stato impiegato per la quantizzazione del DNA di interesse attraverso la visualizzazione su gel di agarosio all'1% ed il confronto delle bande formatesi con bande di quantità note di DNA ladder (1 Kb, Neb).

Questa procedura è stata attuata per ricavare la quantità di A-Tailing necessaria per compiere la reazione di ligation, tra il vettore di clonaggio pCRII ed il prodotto di PCR, seguendo le istruzioni presenti nel kit “Dual Promoter (pCRII) per TA Cloning” (Invitrogen).

La reazione è stata svolta in un volume finale di 10 µl con 50 ng di inserto e 50 ng di vettore usando una molar ratio inserto: vettore di 4:1.

Dopo la reazione di ligation, al fine di inserire al loro interno il plasmide, sono state prese delle cellule competenti di *E.coli* del ceppo DH5α e sono state trasformate con il vettore pCRIIZip9 mediante elettroporazione.

A ciascuna aliquota di cellule competenti, pari a 50 µl, sono stati aggiunti 5 µl del mix della reazione di ligation e la trasformazione è stata effettuata utilizzando l'elettroporatore “BIORAD Gene Pulser Xcell”, settato secondo i seguenti parametri:

- Cuvette 2mm
- Capacità 25 µF
- Voltaggio 2,5 kV
- Resistenza 200 Ω.

Successivamente le cellule sono state poste in 450 µl di mezzo LB e lasciate un'ora in agitazione nell'incubatore a 37°C.

L'elettroporato è stato poi piastrato su mezzo agar LB con ampicillina (100 mg/ml), trattato in precedenza con 20 µl di X-Gal (20 mg/ml) e 100 µl di IPTG (0,1 M).

L'IPTG è una molecola analoga al lattosio, utilizzata, in queste cellule di *E.coli*, per indurre l'espressione dei geni sotto il controllo dell'operone Lac.

Una volta trasformati, i batteri di *E.coli* se, pur essendo trasformati con il plasmide, ne contengono una copia in cui non è presente l'inserito, risultano in grado di produrre l'enzima β-galattosidasi (codificato dal gene Lac Z) che può scindere l'X-gal in galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-idrossindolo, dando luogo a delle colonie blu; mentre, se il vettore presenta l'inserito a livello del promotore Lac, non si ha la scissione di X-Gal per cui le colonie risultano bianche.

Una volta trasformate, le cellule sono state fatte incubare a 37 °C over night.

Le colonie risultate positive per l'inserito in seguito allo screening bianco blu, sono state sottoposte ad una reazione di colony-PCR in cui sono stati usati i primer universali M13 (tabella 2.4) che allineano sul vettore pCRII.

Primer		Sequenza
M13	forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13	reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

**Tabella 2.4:** sequenze dei primer M13.

Per ciascuna colonia da saggiare è stato preparato un mix di reazione di PCR in un volume finale di 10 µl contenente:

- 0,2 µl di primer M13 forward (10 mM)
- 0,2 µl di primer M13 reverse (10 mM)
- 0,2 µl di dNTP (2 mM)
- 0,6 µl di MgCl<sub>2</sub> (50 mM)

- 1 µl di Taq Buffer (10 X)
- 0,5 µl di Taq
- 7,3 µl di H<sub>2</sub>O.

La reazione è stata svolta nelle seguenti condizioni:

- denaturazione iniziale a 94 °C per 2 minuti
- denaturazione a 94 °C per 20 secondi
- annealing a 54 °C per 20 secondi
- estensione a 72 °C per 1 minuto e 15 secondi
- per 39 cicli
- fine reazione a 72 °C per 5 minuti.

Una volta portata a termine la reazione i prodotti di PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% usando come DNA ladder la 1Kb.

Le colonie risultate positive per l'inserito sono state quindi inoculate in 6 ml di LB con kanamicina (50 mg/ml) ed incubate in agitazione a 37 °C over night.

Il DNA plasmidico è stato poi estratto dagli inoculi mediante l'uso del kit “E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I” (OMEGA biotek), seguendo le istruzioni del produttore.

La quantizzazione del prodotto della “miniprep” è stata effettuata sia mediante l'utilizzo dello spettrofotometro SPECTRO *Star<sup>Nano</sup>* (BMG LABTECH), sia mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% con 6 µl di DNA ladder (1 Kb), dopo aver aggiunto al prodotto di reazione 1 µl di Loading buffer (6 X).

La presenza dell'inserito con il gene *zip9* nel plasmide pCRII è stata poi verificata attraverso delle PCR di controllo.

Queste sono state eseguite in 10 µl di volume finale, utilizzando circa 20 ng di pCRIIZip9 e

facendo, per ciascuna colonia, due mix di reazione: uno usando come primer M13 forward e reverse e l'altro usando come primer Zip9 forward e reverse.

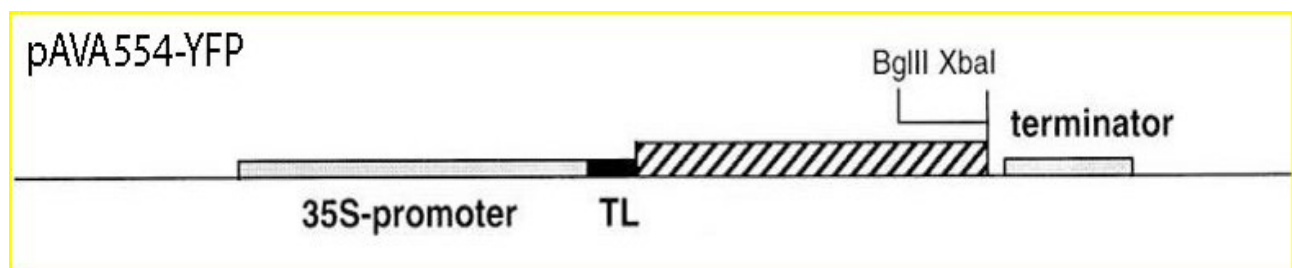
Le condizioni di reazione sono state le medesime della reazione di colony-PCR prima descritta, fatta eccezione per la temperatura di annealing di 55 °C.

Per confermare la presenza dell'inserto, il prodotto della reazione è stato poi sottoposto ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, con DNA ladder (1 kb).

Infine, il plasmide di ogni colonia positiva per l'inserto è stato sequenziato sia con il primer M13 forward sia con il primer M13 reverse dalla Ditta Primm.

## 2.2 Clonaggio del gene *zip9* per la localizzazione subcellulare

La sequenza del gene *zip9* è stata clonata all'interno del vettore di espressione transiente pAVA 554 (figura 2.2) *in frame* al gene che codifica per la yellow fluorescent protein (YFP) al fine di consentire lo studio di localizzazione subcellulare della proteina di interesse.



**Figura 2.2:** vettore pAVA 554, necessario per l'espressione transiente, in cellule vegetali, di proteine di fusione all'estremità C-terminale della YFP. La cassetta di espressione del vettore pAVA 554 presenta un gene reporter per la YFP, alla cui estremità 3' sono presenti siti di restrizione degli enzimi BglII e XbaI per il clonaggio degli inserti ed il promotore costitutivo CaMV35S.

In particolare, per poter inserire il gene *zip9* all'interno del vettore pAVA 554 sono stati introdotti, mediante PCR, all'estremità del cDNA, i siti di restrizione specifici per gli enzimi XbaI e BglII.

Circa 20 ng del plasmide pCRIIZip9 sono stati utilizzati come DNA template per realizzare una

PCR High Fidelity mediante il kit “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (New England BioLabs), seguendo la procedura standard indicata dal produttore.

La reazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl, con i primers Zip9/BglIII forward e Zip9/XbaI reverse ( tabella 2.5), contenente:

- 0,5 µl di pCRIIZip9
- 10 µl di Phusion Reaction Buffer (5 X)
- 2.5 µl di primer Zip9/BglIII forward (10 µM)
- 2,5 µl di primer Zip9/XbaI reverse (10 µM)
- 1 µl di dNTP (2 mM)
- 0,5 µl di Phusion High- Fidelity DNA Polymerase
- 33 µl di H<sub>2</sub>O.

Primer		Sequenza
Zip9/BglIII	forward	5'-AGATCTATCTATGCCTTGTTTGAAAAC-3'
Zip9/XbaI	reverse	5'-TCTAGATATCCCAAATCATAACAAC-3'

**Tabella 2.5:** sequenze dei primer Zip9/BglIII forward e Zip9/XbaI reverse.

La reazione è stata svolta nelle seguenti condizioni:

- denaturazione iniziale 98 °C per 2 minuti
- denaturazione a 98 °C per 10 secondi
- annealing a 60 °C per 20 secondi
- estensione a 72 °C per 20 secondi
- per 35 cicli
- fine reazione a 72 °C per 5 minuti.

Una volta portata a termine la reazione, al fine di verificare la corretta amplificazione, un'aliquota del prodotto di PCR è stata fatta correre su gel di agarosio all'1% come descritto in precedenza.

Il prodotto di PCR rimanente è stato poi purificato direttamente dal gel di agarosio al 2% utilizzando il kit “Nucleo Spin Gel PCR Cleanup” (Macherey-Nagel) seguendo la procedura indicata dal produttore.

Il DNA plasmidico ottenuto dalla purificazione è stato poi impiegato in una reazione di A-Tailing e sottoposto a quantificazione come descritto nel paragrafo 2.1.

La reazione di ligation successiva si è svolta, a 25 °C per 2 ore, in un volume finale di 10 µl con il kit “Dual Promoter TA Cloning kit” (Invitrogen) aggiungendo:

- 2 µl di vettore pCRII (50 ng)
- 2 µl di ligation buffer (5 X)
- 2,5 µl di prodotto dell' A-Tailing (14,70 ng)
- 2,5 µl di H<sub>2</sub>O
- 1 µl di T4 DNA Ligase.

Successivamente 50 µl di cellule competenti DH5α di *E.coli* sono state trasformate con 5µl di prodotto di ligation, quindi, piastrate e sottoposte a screening bianco-blu come precedentemente illustrato nel paragrafo 2.1. Tra le colonie risultate positive allo screening, la colonia 3 è stata inoculata in 6 ml di mezzo LB con 6 µl di ampicillina (100 mg/ml) e posta in agitazione a 37°C over night.

Sono state quindi eseguite l'estrazione del DNA plasmidico ed una PCR per saggiare il giusto inserimento nel vettore pCRII dell'inserto BglII-Zip9-XbaI come illustrato nel paragrafo 2.1.

In ultimo sono stati preparati due tubi con 660 ng di DNA ciascuno, con il primer M13 forward in un caso ed il primer M13 reverse nell'altro.

Le miscele sono state liofilizzate mediante un processo di disidratazione avvenuto a 60 °C e quindi inviate per il sequenziamento.

Il gene codificante per ZIP9, posto tra le sequenze dei siti di restrizione per gli enzimi BglII ed

XbaI, è stato poi clonato nel vettore per l' espressione transiente di cellule vegetali pAVA 554, caratterizzato dal promotore costitutivo CaMV35S.

La presenza di questi siti è fondamentale per il giusto clonaggio del gene *in frame* con la YFP all'interno del vettore plasmidico.

La sequenza BglII-zip9-XbaI (4µg) è stata isolata dal vettore di clonaggio pCRII mediante una doppia digestione in un volume finale di 50 µl usando:

- 33,6 µl di pCRII con inserto BglII-Zip9-XbaI
- 5 µl di NEBuffer2 (10 X)
- 5 µl di BSA (10 X)
- 2,5 µl di enzima BglII
- 2,5 µ di enzima XbaI
- 2,4 µl di H<sub>2</sub>O.

Il mix di reazione è stato lasciato ad incubare per 4 ore a 37 °C.

Il vettore pAVA 554 (circa 4 µg) è stato anch'esso sottoposto ad una doppia digestione al fine di ottenere la sua forma linearizzata.

La prima digestione è stata effettuata in un volume finale di 20 µl con l'enzima di restrizione BglII (New England Biolabs), a 37 °C per 4 ore, aggiungendo:

- 2 µl di NEBuffer2 (10 X)
- 2 µl di enzima BglII
- 14,5 µl di H<sub>2</sub>O
- 1,5 µl di pAVA 554

La digestione successiva è stata fatta in un volume finale di 40 µl con l'enzima di restrizione XbaI (New England Biolabs), a 37 °C per 4 ore, aggiungendo alla prima digestione:

- 2 µl di NEBuffer2 (10 X)
- 2 µl di enzima XbaI
- 4 µl di BSA (10 X)
- 12 µl di H<sub>2</sub>O.

La purificazione di entrambi i prodotti è stata fatta grazie all'utilizzo del kit “ Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up” (Macherei-Nagel) seguendo il protocollo standard fornito dai produttori.

Per quantizzare il prodotto della doppia digestione di BglII-Zip9-XbaI contenuto in pCRII è stata eseguita una corsa su gel di agarosio all'1% nella soluzione tampone TAE (tabella 2.6), dopo aver aggiunto 1 µl di Loading buffer (6 X), usando 6 µl di DNA ladder (1 kb). È stata, in aggiunta, eseguita la quantizzazione del pAVA con la stessa procedura utilizzata per quantizzare il prodotto della doppia digestione.

Tampone TAE 10 X	
Reagente	Composizione
Tris	24,2 % (w/v)
Acido acetico glaciale	5,7 % (w/v)
EDTA 0,5M pH8	1% (v/v)

**Tabella 2.6:** composizione del tampone di corsa per elettroforesi TAE (10 X).

La successiva reazione di ligation è stata eseguita tra il vettore di clonaggio pAVA 554 e l'inserto *zip9*, precedentemente digeriti con gli enzimi di restrizione XbaI e BglII (New England Biolabs), in un volume finale pari a 20 µl con una molar ratio inserto: vettore di 3:1, usando:

- 4 µl di Ligation buffer (5 X)
- 1,2 µl di vettore (70 ng)
- 2,1 µl di inserto (44 ng)
- 1 µl di T4 DNA Ligasi
- 11,7 µl di H<sub>2</sub>O.



La reazione è stata posta in incubazione a 14 °C over-night.

Il vettore pAVA554Zip9 prodotto della ligation è stato utilizzato nella trasformazione di cellule competenti DH5α di *E.coli* come illustrato in precedenza.

Le colonie sono state poi sottoposte a colony-PCR al fine di accertare il corretto inserimento della sequenza *zip9* in pAVA554. Per ciascuna delle colonie da saggiare è stato fatto un mix di reazione usando come primer pAVA-GFP forward (tabella 2.7), che si allinea sul vettore pAVA554, e Zip9 reverse (tabella 2.1) in un volume finale di 10 µl aggiungendo:

- 0,2 µl di primer pAVA-GFP forward (10 µM)
- 0,2 µl di primer Zip9 reverse (10 µM)
- 0,2 µl di dNTP (2 mM)
- 1 µl di Taq Buffer (10 X)
- 0,6 µl di MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 0,5 µl di Taq
- 7,3 µl di H<sub>2</sub>O.

Le condizioni di reazione sono le medesime riportate nel paragrafo 2.1 fatta eccezione per la temperatura di annealing di 53 °C.

Primer		Sequenza
pAVA-GFP	forward	5'-ACCAGACAACCATTACCT-3'

**Tabella 2.7:** sequenza del primer pAVA-GFP forward .

I prodotti della colony-PCR sono stati poi sottoposti ad una corsa elettroforetica e visualizzati su gel TAE all'1% usando come DNA ladder la 1 Kb.

In seguito è stato realizzato un inoculo di due colonie contenenti il gene di interesse in 6 ml di LB con 6 µl di ampicillina (100 mg/ml) e lasciato in agitazione a 37 °C over-night.

Il DNA plasmidico è stato estratto grazie al kit “Plasmid DNA Mini Kit I” (Omega Bio-Tek), seguendo le istruzioni del produttore. È stata quindi fatta un'ulteriore digestione di controllo del

DNA plasmidico utilizzando gli enzimi di restrizione BglII ed XbaI (New England Biolabs) in un volume finale di 10 µl impiegando:

- 1 µl di NEBuffer2 (10 X)
- 0,5 µl di enzima BglII
- 0,5 µl di enzima XbaI
- 1 µl BSA (10 X)
- 1,3 µl di DNA plasmidico (420 ng)
- 5,7 µl di H<sub>2</sub>O.

Il mix di reazione è stato lasciato per 2 ore a 37 °C.

Un' ulteriore verifica, mediante PCR, è stata compiuta utilizzando circa 15 ng di DNA template e come primer il 35S-Pro forward, che allinea sul promotore del vettore (tabella 2.8), e lo Zip9 reverse in un volume finale di 10 µl usando:

- 0,2 µl di 35S-Pro forward (10 µM)
- 0,2 µl di primer Zip9 reverse (10 µM)
- 0,2 µl di dNTP (10 mM)
- 1 µl di Taq Buffer (10 X)
- 0,6 µl di MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 0,5 µl di DNA plasmidico (314,73 ng)
- 0,5 µl Taq
- 6,8 µl H<sub>2</sub>O.

Le condizioni di reazione sono state le seguenti:

- denaturazione a 94 °C per 2 minuti
- denaturazione a 94 °C per 20 secondi

- annealing a 53°C per 20 secondi
- estensione a 72°C 2 minuti e 15 secondi
- per 39 cicli
- fine reazione a 72 °C per 5 minuti.

Primer		Sequenza
35SPro	forward	5'-GACCCTTCCTCTATATAAGG-3'

**Tabella 2.8:** sequenza del primer 35SPro forward.

Il risultato di queste verifiche è stato sottoposto ad elettroforesi e visualizzato su gel di TAE all'1%.

Una delle colonie che si sono rivelate positive alle procedure illustrate precedentemente è stata inoculata in 300 ml di mezzo LB con ampicillina (100 mg/ml) ed incubata a 37 °C in agitazione over night.

La crescita ottenuta è stata quindi impiegata per purificare il plasmide mediante l'uso del kit “Pure Link™ Hi Pure Plasmid Filter Maxiprep Kits” (Invitrogen) procedendo secondo il protocollo standard indicato dal produttore.

Il DNA plasmidico di pAVA554Zip9 è stato poi quantizzato sia grazie all'uso dello spettrofotometro SPECTROStar<sup>Nano</sup> (BMG LABTECH), sia attraverso una corsa elettroforetica su gel TAE all'1%. Infine, quest'ultimo è stato impiegato per la trasformazione transiente dei protoplasti di *Arabidopsis thaliana*.

## 2.3 Trasformazione dei protoplasti di *Arabidopsis thaliana*

I protoplasti sono stati ricavati da una coltura cellulare di *Arabidopsis thaliana* appartenente all'ecotipo Landsberg di 3 giorni e trasfettati attraverso elettroporazione come descritto da Pitto et al. (2000) e Scebba et al. (2003).

La digestione delle pareti cellulari è stata effettuata al buio a 25 °C per 2 ore in agitazione, usando

un rapporto tra cellule e soluzione enzimatica di 1:10. La soluzione enzimatica è stata allestita in un volume di 10 ml di soluzione A (tabella 2.9), usando:

- 1% (w/v) Cellulase
- 0,5% (w/v) Macerozima
- 0,5 % (w/v) BSA (Bovine Serum Albumin)
- 0,1 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanolo.

Soluzione A (pH 5,6) dose per 500 ml	
Reagente	Concentrazione
Mannitolo	0,2 M
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,08 M
MES	0,5 % (w/v)

**Tabella 2.9:** composizione della Soluzione A.

Il livello di digestione è stato osservato utilizzando il microscopio ottico. In seguito i protoplasti ottenuti sono stati sottoposti a lavaggio in Soluzione A per tre volte, quindi, risospesi nel tampone di elettroporazione (tabella 2.10) con una concentrazione pari a  $7,5 \times 10^6$  protoplasti/ ml.

Ogni 0,4 ml di protoplasti è stato trasfettato con 20  $\mu$ g di DNA plasmidico di interesse.

Tampone di elettroporazione (pH 7,2)	
Reagente	Concentrazione
Hepes	10 mM
KCl	120 mM
NaCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	4 mM
Mannitolo	0,2 M

**Tabella 2.10:** composizione del Tampone di elettroporazione.

La trasfezione è stata eseguita grazie all'utilizzo dell'elettroporatore “BIORAD Gene Pulser Xcell” impostato con i seguenti parametri:

- Voltaggio 250 V

- Capacità 350  $\mu\text{F}$
- Resistenza 8  $\Omega$
- Cuvette 4 mm.

Trascorsi 10 minuti in ghiaccio, l'elettroporato è stato posto in capsule Nunc da 6 cm di diametro contenenti 2,1 ml di mezzo di crescita MS a pH 5,8 (Murashige e Skoog, 1962), 3% di saccarosio, mannitolo 0,3 M, acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) 0,1 mg/l, 6-benzilamminopurina (6-BAP) 0,2 mg/l ed acido  $\alpha$ -naftalene acetico ( $\alpha$ -NAA)  $10^{-6}$  M.

La visualizzazione è avvenuta attraverso l'osservazione al microscopio confocale Leica TCS SP2 una volta terminata una incubazione al buio a 25 °C per 24 ore.

## **2.4 Trattamento con Cd di *Populus alba* L.clone Villafranca ed isolamento dell'RNA**

Piante di *Populus alba* L.clone Villafranca, ottenute da una coltura *in vitro*, sono state poste per tre settimane in una camera di crescita, in condizioni ambientali controllate, per l'acclimatazione *in vivo* (temperatura giorno: notte di 23:18 °C, 65-70% di umidità relativa e fotoperiodo di 16 ore ad una densità di PPF (photosynthetic photon flux) di 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornita da lampade a fluorescenza).

Dopo il periodo di acclimatazione le piante sono state trasferite in microlisimetri, alti 50 cm e con diametro pari a 12 cm, riempiti di argilla espansa e sabbia (1:1/ v:v).

Due settimane dopo, dodici piante sono state divise casualmente in tre gruppi di trattamento (n=4) ed irrigate con una soluzione nutritiva Hoagland a metà forza (pH= 6.5), con 50 e 100  $\mu\text{M}$  di Cd ( $\text{CdSO}_4$ ) in aggiunta, al fine di raggiungere le seguenti concentrazioni totali di cadmio nel substrato dei microlisimetri: 0 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$  come controllo ( $\text{Cd}_c$ ), 0.5 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$  come concentrazione minore di cadmio ( $\text{Cd}_l$ ) ed 1 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$  come concentrazione maggiore di cadmio ( $\text{Cd}_h$ ).

Il cadmio è stato fornito come  $\text{CdSO}_4$  completamente disciolto nella soluzione nutriente e distribuito in due frangenti, ossia all'inizio dell'esperimento ( $T_0$ ) e dopo tre settimane ( $T_1$ ), senza mai oltrepassare la capacità di ritenzione idrica del terreno. Le piante sono state, quindi, cresciute in queste condizioni per sei settimane.

L'RNA totale è stato estratto dalle foglie ( $n=3$ ) apicali, mediane e basali usando lo Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) seguendo il protocollo indicato dal produttore. L'integrità dell'RNA è stata saggiata attraverso elettroforesi usando il bromuro di etidio.

La sintesi del cDNA è stata ottenuta mediante il Quantitect Rev Transcription Kit (Qiagen) seguendo il protocollo standard descritto nelle istruzioni fornite dalla ditta.

## **2.5 Analisi dei livelli di espressione del gene *zip9***

I livelli di espressione del gene *zip9* sono stati valutati mediante reazioni di RealTime-PCR (RT-qPCR) facendo uso del kit “SsoFast EvaGreen Supermix” (BIO-RAD).

Il cDNA che è stato oggetto di questo studio è stato prodotto dall'RNA estratto da foglie apicali, mediane e basali di piante di *Populus alba* clone Villafranca cresciute per 6 settimane in un mezzo contenente concentrazioni di cadmio pari a 0 ( $\text{Cd}_c$ ), 0,5 ( $\text{Cd}_l$ ) e 1 ( $\text{Cd}_h$ )  $\text{mg Kg}^{-1}$  (Romè et al., 2015). Per ciascuna tipologia di foglia è stato esaminato il livello di espressione relativa del gene *zip9* attraverso il confronto, in un primo momento, con il gene housekeeping 18S che, però, si è rivelato non essere espresso in modo uniforme nei tessuti presi in considerazione.

Come gene di riferimento è stato, quindi, utilizzato il gene housekeeping EF1- $\alpha$  codificante per l'elongation factor 1- $\alpha$ . I primer utilizzati in queste reazioni sono EF1- $\alpha$  forward e reverse e *Zip9* forward e reverse (tabella 2.11).

Ciascuna reazione è stata preparata in un volume finale pari a 10  $\mu\text{l}$  al cui interno erano presenti:

- 2  $\mu\text{l}$  di cDNA
- 2,4  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$

- 0,6 µl di mix di primer forward e reverse (10 µM)
- 5 µl di SsoFast EvaGreen Supermix

Primer		Sequenza
EF1α	forward	5'-AAGAGGACAAGAAGGCAGCA-3'
EF1α	reverse	5'-CTAACCGCCTTCTCCAACAC-3'
Zip9	forward	5'-ATGCCTTGTTTGAAAATCCCA-3'
Zip9	reverse	5'-TCAATCCCAAATCATAACAATGCA-3'

**Tabella 2.11:** sequenze dei primer impiegati nelle reazioni di Real Time PCR quantitative.

Le reazioni sono state svolte mediante l'utilizzo dello strumento “Eco Real Time PCR System” (Illumina), secondo le seguenti condizioni:

- attivazione della Taq polimerasi a 95 °C per 10 minuti
- denaturazione a 95 °C per 15 secondi
- annealing ed estensione a 55 °C per 30 secondi
- 45 cicli
- curva di melting

95 °C per 15 secondi

53 °C per 15 secondi

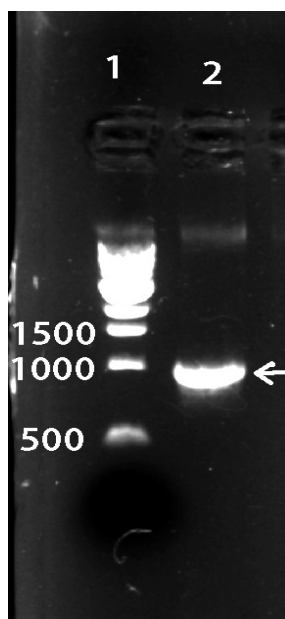
95 °C per 15 secondi.

L'analisi statistica per la validazione dell'espressione del gene è stata condotta mediante l'uso del software GraphPad Prism6. I dati sono stati riportati come media ± SEM (n=3) ed analizzati mediante l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) ed il Turkey's multiple comparison test utilizzando un livello di significatività pari a 0,05.

## Risultati

### 3.1 Clonaggio del gene *zip9* da cDNA di *P. x euroamericana* clone I-214

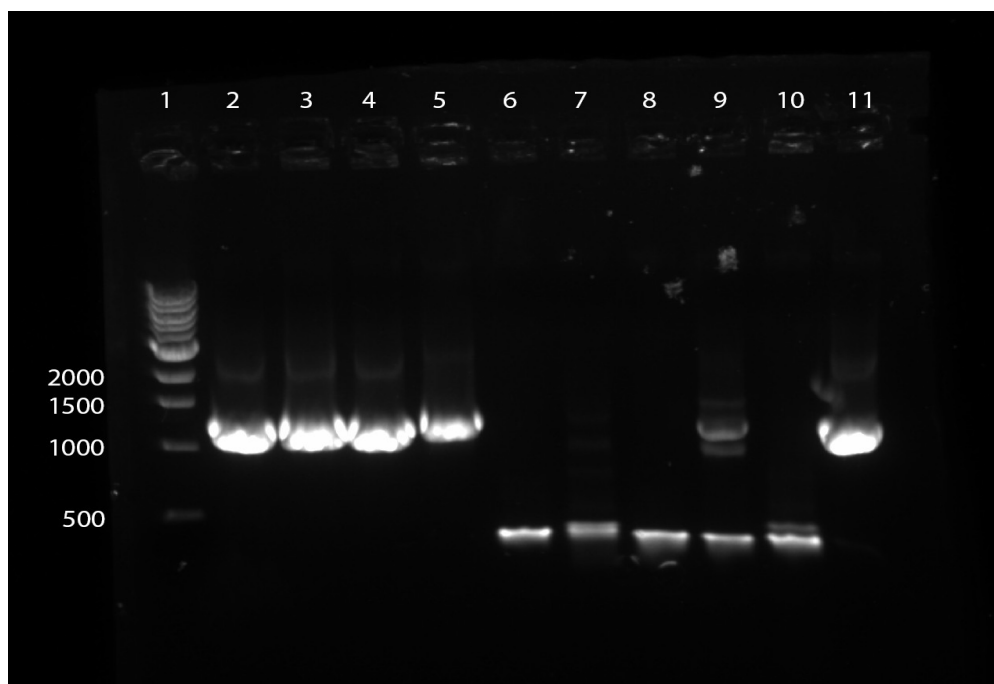
Il gene *zip9* è stato clonato a partire dal cDNA di *P. x euroamericana* clone I-214 mediante una reazione di PCR High Fidelity, il cui prodotto è stato fatto correre su gel di agarosio all'1% mostrando la presenza di una banda di 1002 bp (figura 3.1).



**Figura 3.1:** Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dei prodotti della Phusion High Fidelity. Nella prima colonna è stato caricato il marker 1 Kb (Neb), nella colonna 2 il prodotto di reazione. La banda presente nella colonna 2 mostra il profilo atteso.

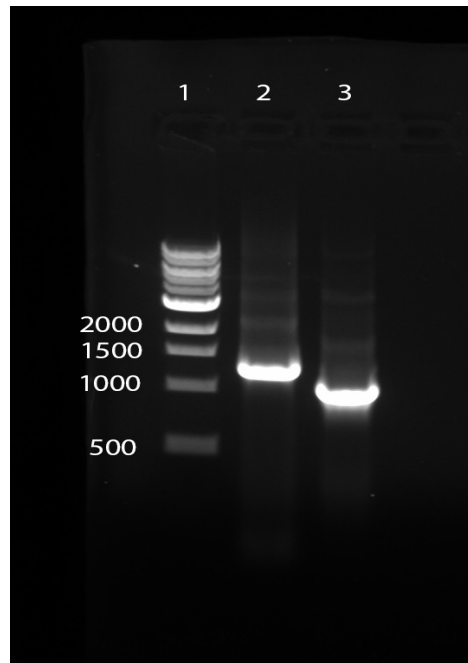
Le colonie di *E.coli* positive allo screening bianco-blu trasformate con il vettore di clonaggio pCRII contenente il prodotto dell'amplificazione sono state usate per una reazione di colony PCR, i cui prodotti sono stati visualizzati su gel di agarosio all'1%. Sei colonie risultavano contenenti l'inserito, in quanto mostravano su gel una banda di circa 1000 bp (figura 3.2).



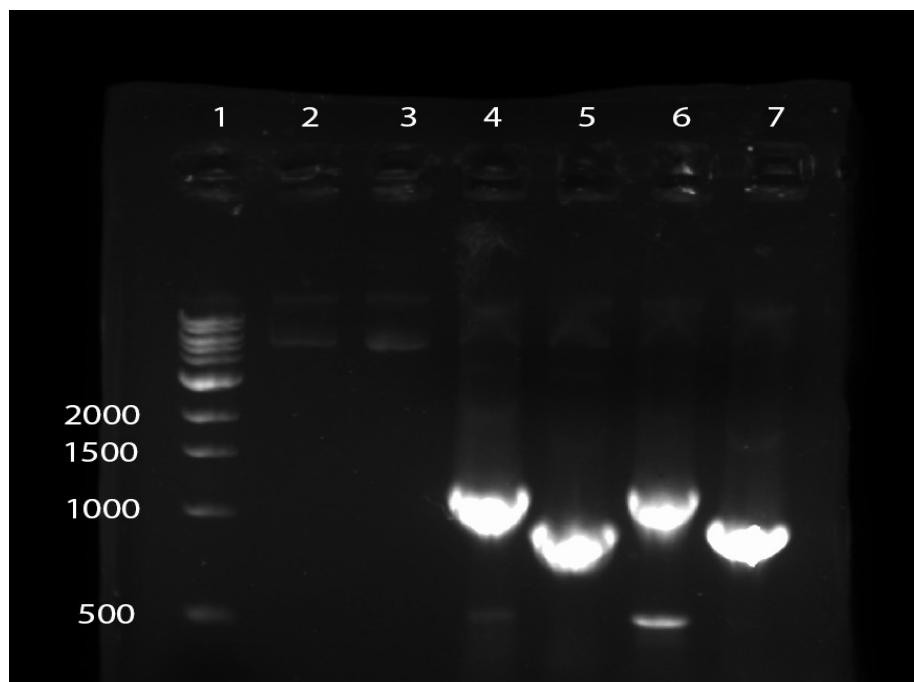


**Figura 3.2:** Elettroforesi su gel di agarosio all'1% della colony PCR. Nella prima colonna è stato caricato il marker 1 Kb (Neb), nelle colonne 2-11 i prodotti di reazione di 10 colonie testate. Le colonie nelle colonne 2, 3, 4, 5, 9 ed 11 mostrano il profilo di bande atteso.

I risultati delle PCR di controllo fatte con i primer M13 forward ed M13 reverse sul plasmide di tre delle colonie hanno mostrato il profilo di bande atteso, ossia due bande rispettivamente di 1000 bp e di 1200 bp (figura 3.3 e 3.4).



**Figura 3.3:** Elettroforesi su gel di agarosio all'1% della PCR di controllo della colonia 1 risultata positiva per l'inserto. Nella colonna 1 è presente il marker 1Kb (Neb), nella colonna 2 è stato caricato il prodotto della reazione della colonia 1 con i primers M13 forward e reverse, nella colonna 3 è stato caricato il prodotto della reazione della colonia 1 con i primers Zip9 forward e reverse. Le bande nelle colonne 2 e 3 mostrano il profilo atteso.



**Figura 3.4:** Elettroforesi su gel di agarosio all'1% della PCR di controllo delle colonie 2 e 4 risultate positive per l'inserto. Nella colonna 1 è presente il marker 1Kb (Neb), nella colonna 4 è stato caricato il prodotto di

reazione della colonia 2 con i primer M13 forward e reverse, nella colonna 5 è stato caricato il prodotto di reazione della colonia 2 con i primer Zip9 forward e reverse, nella colonna 6 è stato caricato il prodotto di reazione della colonia 4 con i primer M13 forward e reverse ed, infine, nella colonna 7 è stato caricato il prodotto di reazione della colonia 4 con i primer Zip9 forward e reverse. Entrambe le colonie mostrano il profilo di bande atteso.

I risultati del sequenziamento hanno mostrato la presenza di un'unica isoforma del gene *zip9* poiché, in tutte le colonie sequenziate, è stato possibile osservare un'omologia di sequenza pari al 100% .

Tramite l'utilizzo di algoritmi di analisi ed allineamento CLUSTAL è stato possibile verificare che la sequenza del gene *zip9* risulta per il 99% omologa a quella dell'RNA messaggero dell'hypotetical protein (POPTR-009s03950) dell'organismo di riferimento *Populus trichocarpa* ( figura 3.5).

```

c1      atgccttggttgaaaactcccaagtcaacctctttggtgatctctctgatattgatcctg
c2      atgccttggttgaaaactcccaagtcaacctctttggtgatctctctgatattgatcctg
c4      atgccttggttgaaaactcccaagtcaacctctttggtgatctctctgatattgatcctg
P.trichocarpa atgccttggttgaaaactcccaagtcaacctctttggtgatctctctgatattgatcctg
*****.*****

c1      caattctctttaatcagtagccacggaggtcatgatggaaacgacagcagcgagggtaac
c2      caattctctttaatcagtagccacggaggtcatgatggaaacgacagcagcgagggtaac
c4      caattctctttaatcagtagccacggaggtcatgatggaaacgacagcagcgagggtaac
P.trichocarpa caattctctttaatcagtagccacggaggtcatgatggaaacgacagcagcgagggtaac
*****

c1      gtacatttgcatcgcgaaaagcttgattctggtgaaagtatggtggttgatcatactgcta
c2      gtacatttgcatcgcgaaaagcttgattctggtgaaagtatggtggttgatcatactgcta
c4      gtacatttgcatcgcgaaaagcttgattctggtgaaagtatggtggttgatcatactgcta
P.trichocarpa gtacatttgcatcgcgaaaagcttgattctggtgaaagtatggtggttgatcatactgcta
*****

c1      gttaccacattgcgagctggtatctctccctacttctatcgatggaacgagaatttcctt
c2      gttaccacattgcgagctggtatctctccctacttctatcgatggaacgagaatttcctt
c4      gttaccacattgcgagctggtatctctccctacttctatcgatggaacgagaatttcctt
P.trichocarpa gttaccacattgcgaggtggtatctctccctacttctatcgatggaacgagaatttcctt
*****

c1      ctcttgggcacacaatttgccggcggggtttttctagggacctctctcatgcatttccttg
c2      ctcttgggcacacaatttgccggcggggtttttctagggacctctctcatgcatttccttg
c4      ctcttgggcacacaatttgccggcggggtttttctagggacctctctcatgcatttccttg
P.trichocarpa ctcttgggcacacaatttgccggcggggtttttctagggacctctctcatgcatttccttg
*****

```

c1	agcgattcggctgataactcttagcaatctcactaccaagacataaccctttctcgttcatg
c2	agcgattcggctgataactcttagcaatctcactaccaagacataaccctttctcgttcatg
c4	agcgattcggctgataactcttagcaatctcactaccaagacataaccctttctcgttcatg
P.trichocarpa	agcgattcggctgataactcttagcaatctcactaccaagacataaccctttctcgttcatg *****
c1	ctagcctctgctggctatcttttaaccatgcttggtgattgcatagtgatgttcgtaaca
c2	ctagcctctgctggctatcttttaaccatgcttggtgattgcatagtgatgttcgtaaca
c4	ctagcctctgctggctatcttttaaccatgcttggtgattgcatagtgatgttcgtaaca
P.trichocarpa	ctagcctctgctggctatcttttaaccatgcttggtgattgcatagtgatgttcgtaaca *****
c1	aggtcaggtgctgaaagagaagctagagtgcaagtggatgaaggaggggtagctcaagag
c2	aggtcaggtgctgaaagagaagctagagtgcaagtggatgaaggaggggtagctcaagag
c4	aggtcaggtgctgaaagagaagctagagtgcaagtggatgaaggaggggtagctcaagag
P.trichocarpa	aggtcaggtgctgaaagagaagctagagtgcaagtggatgaaggaggggtagctcaagag *****
c1	gatgataaagatgtggccatgaatgccgatcccattttcttgaagaccacgtctcttggg
c2	gatgataaagatgtggccatgaatgccgatcccattttcttgaagaccacgtctcttggg
c4	gatgataaagatgtggccatgaatgccgatcccattttcttgaagaccacgtctcttggg
P.trichocarpa	gatgataaagatgtggccatgaatgccgatcccattttcttgaagaccacgtctcttggg *****
c1	gacaccatactactcatccttgcccttggtgttttcattcagtttttgagggaatagccgtt
c2	gacaccatactactcatccttgcccttggtgttttcattcagtttttgagggaatagccgtt
c4	gacaccatactactcatccttgcccttggtgttttcattcagtttttgagggaatagccgtt
P.trichocarpa	gacaccatactactcatccttgcccttggtgttttcattcagtttttgagggaatagccgtt *****
c1	ggagttgcagggactaaggagaggccttggaagaatctttggactatatcattgcacaaa
c2	ggagttgcagggactaaggagaggccttggaagaatctttggactatatcattgcacaaa
c4	ggagttgcagggactaaggagaggccttggaagaatctttggactatatcattgcacaaa
P.trichocarpa	ggagttgcagggactaaggagaggccttggaagaatctttggactatatcattgcacaaa ***** . *****
c1	atctttgcagccattggaatgggaatcgctctgcttaggatgctcccaaagaggccattt
c2	atctttgcagccattggaatgggaatcgctctgcttaggatgctcccaaagaggccattt
c4	atctttgcagccattggaatgggaatcgctctgcttaggatgctcccaaagaggccattt
P.trichocarpa	atctttgcagccattggaatgggaatcgctctgcttaggatgctccgaagaggccattt ***** . *****
c1	ctattaacagcggcatattcttttgcttttgctatttccagcccccttgagtagggata
c2	ctattaacagcggcatattcttttgcttttgctatttccagcccccttgagtagggata
c4	ctattaacagcggcatattcttttgcttttgctatttccagcccccttgagtagggata
P.trichocarpa	ctattaacagcggcatattcttttgcttttgctatttccagcccccttgagtagggata ***** *****
c1	ggcattgccatcgatgccactgctcagggccaagaagctgattggatctttggtatctct
c2	ggcattgccatcgatgccactgctcagggccaagaagctgattggatctttggtatctct
c4	ggcattgccatcgatgccactgctcagggccaagaagctgattggatctttggtatctct
P.trichocarpa	ggcattgccattgatgccactgctcagggccaagaagctgattggatctttggtatctct ***** . *****
c1	atggggccttgcatgtggagtttttatctatgttgccatcaaccatctcatagctaaagga
c2	atggggccttgcatgtggagtttttatctatgttgccatcaaccatctcatagctaaagga
c4	atggggccttgcatgtggagtttttatctatgttgccatcaaccatctcatagctaaagga
P.trichocarpa	atggggccttgcatgtggagtttttatctatgttgccatcaaccatctcatagctaaagga

```

*****
c1      ttccatccacaagctaaattgtacttcgacactccattcttcaagtttggtgctgtgttc
c2      ttccatccacaagctaaattgtacttcgacactccattcttcaagtttggtgctgtgttc
c4      ttccatccacaagctaaattgtacttcgacactccattcttcaagtttggtgctgtgttc
P.trichocarpa ttccatccacaagctaaattgtacttcgacactccattcttcaagtttggtgctgtgttc
*****

c1      cttggggtgggagttattgcagttggttatgatttgggattga
c2      cttggggtgggagttattgcagttggttatgatttgggattga
c4      cttggggtgggagttattgcagttggttatgatttgggattga
P.trichocarpa cttggggtgggagttattgcagttggttatgatttgggattga
*****

```

**Figura 3.5:** Allineamento delle sequenze nucleotidiche del gene *zip9* nelle tre colonie positive per l'inserto e dell'mRNA di *Populus trichocarpa*.

La proteina codificata dal gene in studio è costituita da 333 amminoacidi e si discosta rispetto alla proteina omologa in *Populus trichocarpa* per un solo amminoacido (figura 3.6).

<b>Query</b>	<b>1</b>	<b>MPCLKTPKstslisllililqfslisshgghdgnsdsegnVHLHSKSLILVVWCLIILL</b>	<b>180</b>
<b>Sbjct</b>	<b>1</b>	MPCLKTPKSTSLISLILILQFSLISSHGGHDGNDSEGNVHLHSKSLILVKVWCLIILL	<b>60</b>
<b>Query</b>	<b>181</b>	VTTFAAGISPYFYRWENFLLLGTQFAGGVFLGTSLMHFLSDSADTLSNLTTKTYPFSFM	<b>360</b>
<b>Sbjct</b>	<b>61</b>	VTTFAAGISPYFYRWENFLLLGTQFAGGVFLGTSLMHFLSDSADTLSNLTTKTYPFSFM	<b>120</b>
<b>Query</b>	<b>361</b>	LASAGYLLTMLGDCIVMFVTRSGAEREARVQVDEGGVAQEDDKDVAMNADPIFLKTTSLG	<b>540</b>
<b>Sbjct</b>	<b>121</b>	LASAGYLLTMLGDCIVMFVTRSGAEREARVQVDEGGVAQEDDKDVAMNADPIFLKTTSLG	<b>180</b>
<b>Query</b>	<b>541</b>	DTILLILALCFHSVFEGIAVGVAGTKGEAWKNLWTISLHKIFAAIGMGIALLRMLPKRPF	<b>720</b>
<b>Sbjct</b>	<b>181</b>	DTILLILALCFHSVFEGIAVGVAGTKGEAWRNLWTISLHKIFAAIGMGIALLRMLPKRPF	<b>240</b>
<b>Query</b>	<b>721</b>	LLTAAYSFAFAISSPLGVGIGIAIDATAQGQEADWIFGISMGLACGVFIYVAINHLLIAKG	<b>900</b>
<b>Sbjct</b>	<b>241</b>	LLTAAYSFAFAISSPLGVGIGIAIDATAQGQEADWIFGISMGLACGVFIYVAINHLLIAKG	<b>300</b>
<b>Query</b>	<b>901</b>	FHPQAKLYFDTPFFKFVAVFLGVGVIAVVM IWD	<b>999</b>
<b>Sbjct</b>	<b>301</b>	FHPQAKLYFDTPFFKFVAVFLGVGVIAVVM IWD	<b>33</b>

**Figura 3.6:** allineamento delle sequenze amminoacidiche della proteina codificata dal gene *zip9* e della hypothetical protein di *Populus trichocarpa*. In blu è possibile osservare il residuo di istidina mentre in giallo sono evidenziate le sostituzioni amminoacidiche.

Grazie all'utilizzo del web server NCBI per l'individuazione dei domini conservati, è stato possibile riconoscere la presenza del dominio ZIP dall'amminoacido 50 all'amminoacido 330 della proteina in studio (figura 3.7). Questo dominio è caratteristico dei trasportatori che costituiscono la superfamiglia delle proteine ZIP (pfam02535).

La proteina ZIP9 dispone di 8 domini transmembrana contenuti all'interno del dominio conservato ZIP. Presenta inoltre una regione variabile tra il terzo ed il quarto dominio transmembrana che comprende un residuo di istidina evidenziato in blu nella figura precedente (figura 3.6).

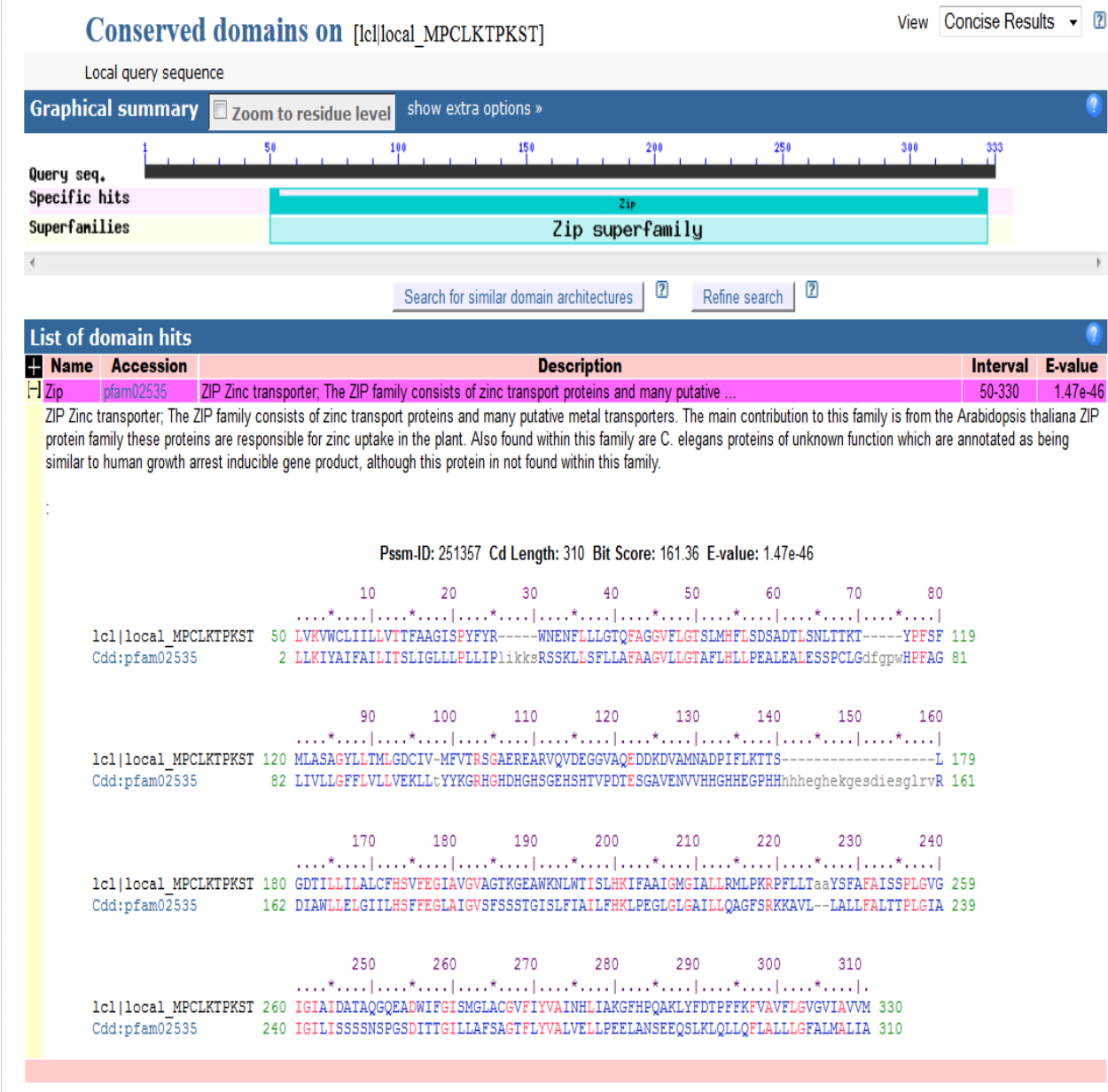
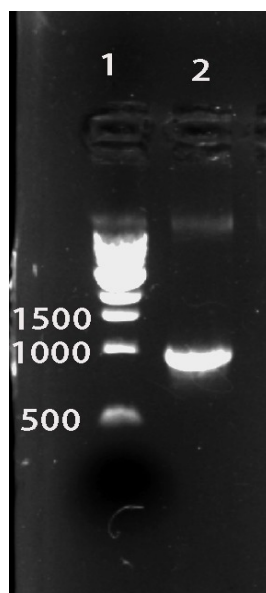


Figura 3.7: dominio ZIP conservato nella proteina ZIP9.

### 3.2 Clonaggio del gene *zip9* per la localizzazione subcellulare

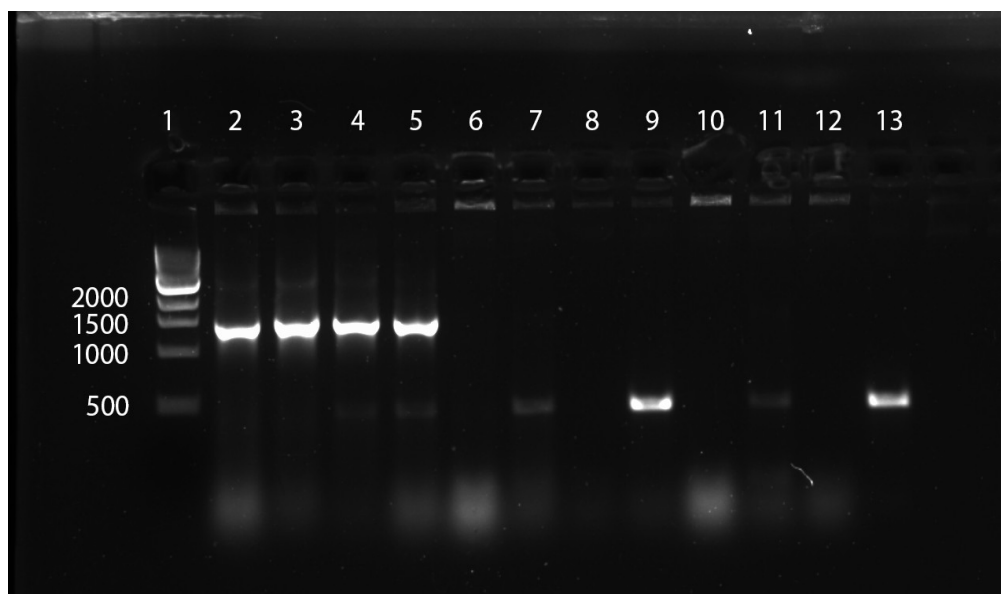
Al fine di clonare il gene *zip9* all'interno del vettore di espressione pAVA554-YFP, mediante PCR, sono stati inseriti, alle estremità della sequenza, i siti di restrizione specifici per gli enzimi BglII ed XbaI.

Il plasmide pCRIIZip9 è stato usato come DNA template per realizzare una reazione di amplificazione PCR High Fidelity al fine di consentirne il clonaggio. Il prodotto di reazione è stato fatto correre su gel di agarosio all'1% mostrando una banda di circa 1000 bp (figura 3.8).



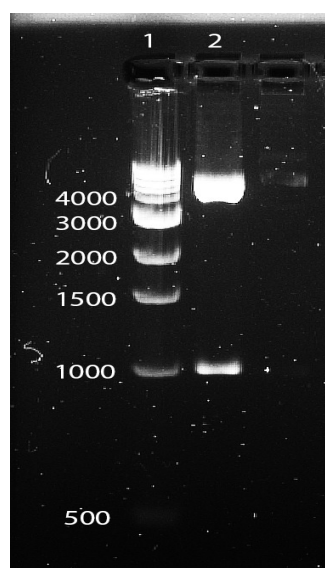
**Figura 3.8:** Elettroforesi su gel di agarosio all'1 % del prodotto della Phusion High Fidelity. Nella colonna 1 è stato caricato il marker 1 Kb (Neb), nella colonna 2 il prodotto di reazione. La banda visibile nella colonna 2 ha mostrato il profilo atteso.

I risultati del sequenziamento hanno poi dato conferma del corretto posizionamento dell'inserto BglII-Zip9-XbaI all'interno del plasmide di clonaggio pCRII. I prodotti della colony PCR, con i primer M13 forward e reverse, per verificare il clonaggio dell'inserto BglII-Zip9-XbaI nel pAVA, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (figura 3.9).



**Figura 3.9:** Elettroforesi su gel di agarosio all'1 % dei prodotti della colony PCR. Nella colonna 1 è stato caricato il marker 1 Kb (Neb), nelle colonne 2-12 i prodotti di reazione di 11 colonie testate, nella colonna 13 il controllo positivo ossia il prodotto della reazione avente come template il plasmide pAVA 554. Le bande presenti nelle colonne 2, 3, 4 e 5 hanno mostrato il profilo atteso.

La corretta inserzione della sequenza del gene *zip9* all'interno del plasmide pAVA554, in una delle colonie risultate positive per la sequenza, è stata saggiata attraverso una doppia digestione con gli enzimi di restrizione BglII ed XbaI, ed il risultato dell'elettroforesi è riportato in figura 3.10, confermandone il risultato.

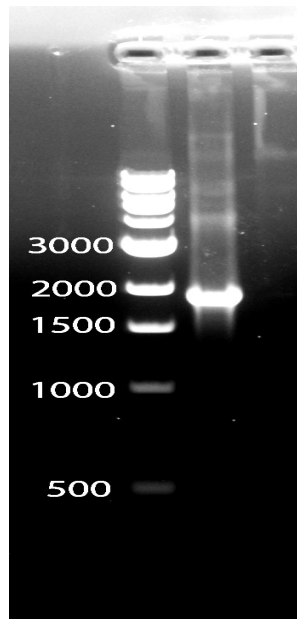


**Figura 3.10:** Elettroforesi su gel di agarosio all'1% dei prodotti di digestione. Nella colonna 1 è stato



caricato il marker 1Kb (Neb) e nella colonna 2 il prodotto della digestione del DNA plasmidico della colonia positiva con gli enzimi di restrizione BglII ed XbaI. La banda presente nella colonna 2 mostra il profilo atteso.

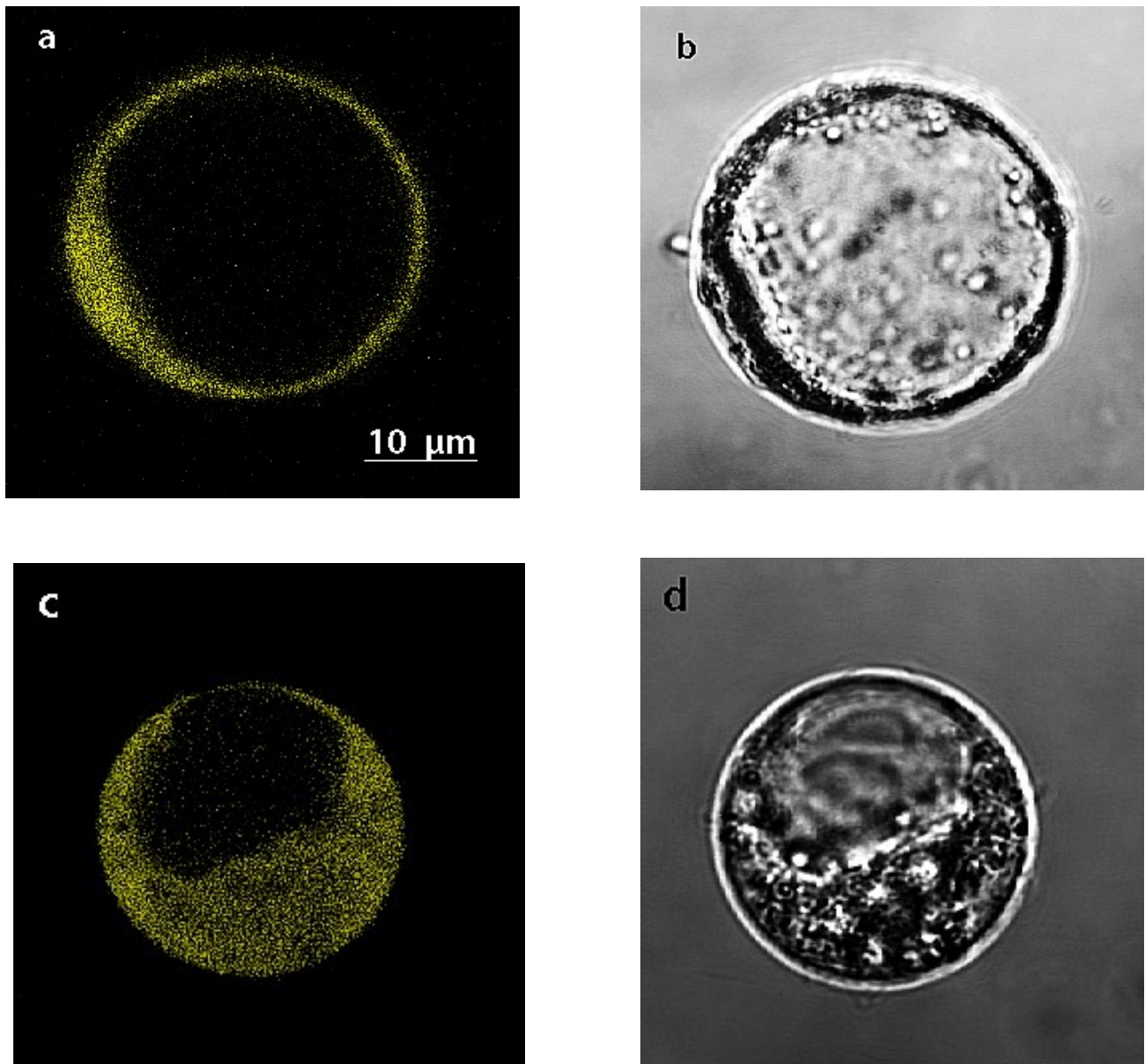
Un'ulteriore conferma è stata ottenuta mediante una PCR di controllo utilizzando come primer il 35SPro forward e lo Zip9 reverse. La colonia risultata positiva per l'inserto ha mostrato il profilo atteso ossia una banda di circa 2000bp (figura 3.11).



**Figura 3.11:** elettroforesi su gel di agarosio all'1% della PCR di controllo della colonia risultata positiva per la sequenza. Nella colonna 1 è stato caricato il marker 1Kb (Neb), nella colonna 2 è stato caricato il prodotto di PCR della colonia 3 con i primer 35SPro forward e Zip9 reverse. La banda presente nella colonna 2 mostra il profilo atteso.

### **3.3 Osservazione al microscopio confocale dei protoplasti di *Arabidopsis* trasfettati con il costrutto pAVA554- YFP-ZIP9.**

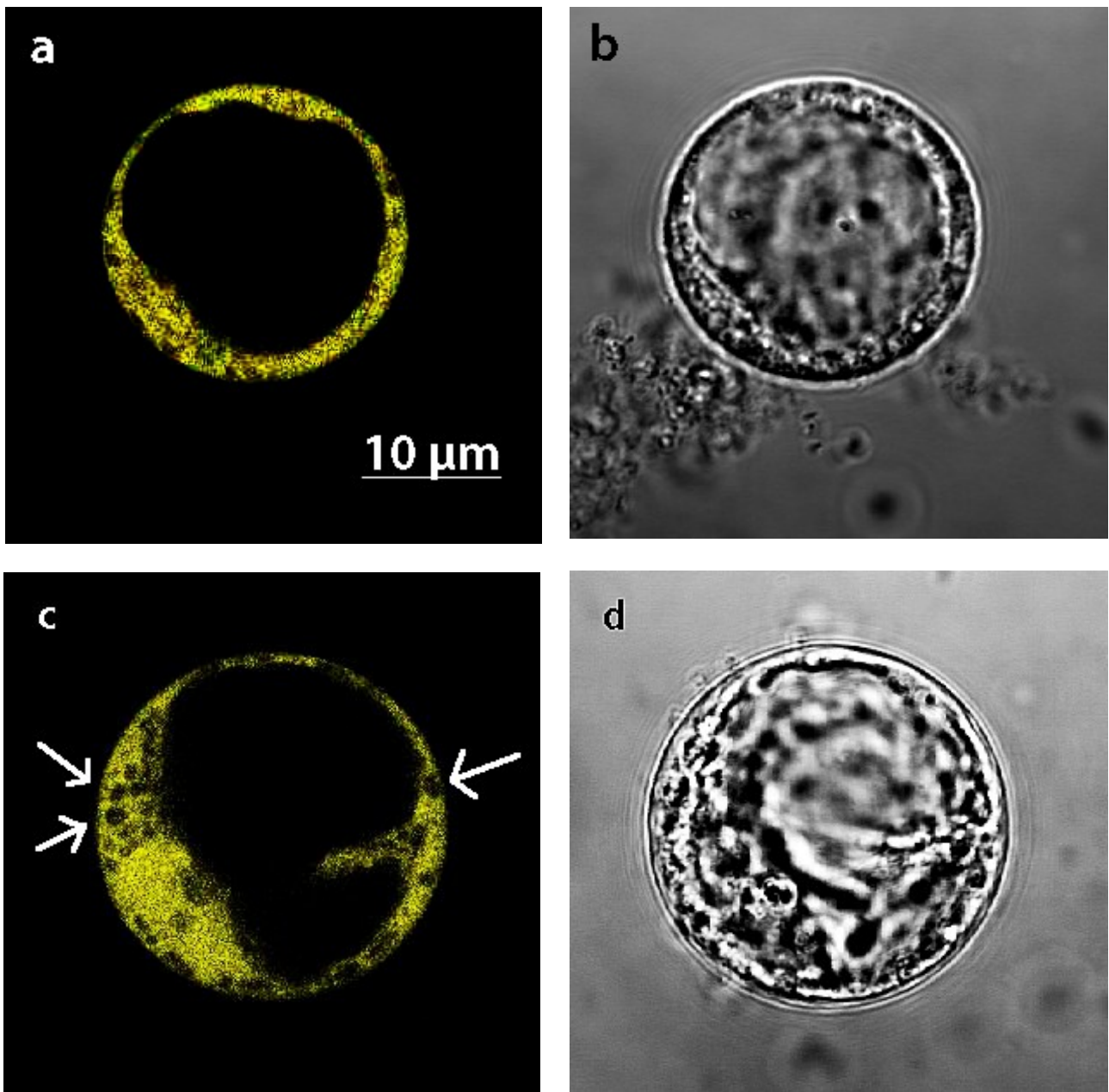
L'osservazione al microscopio confocale dei protoplasti di *Arabidopsis* trasfettati con il costrutto recante il plasmide pAVA 554-YFP-ZIP9 ha fatto emergere i seguenti risultati: la proteina ZIP9-YFP sembra localizzarsi in maniera diffusa all'interno di tutto il sistema endosomiale e nel plasmalemma cellulare (figura 3.12).



**Figura 3.12:** a; c) protoplasti di *Arabidopsis thaliana* trasfettati con il costrutto pAVA554-YFP-Zip9 visti al microscopio confocale con luce fluorescente; b; d) protoplasti di *Arabidopsis thaliana* trasfettati con il costrutto pAVA554-YFP-zip9 osservati al microscopio confocale con luce visibile.

Al fine di valutare se la presenza di zinco in eccesso influisse sulla localizzazione cellulare della proteina, 200 µM di Zn (LD 70) sono stati aggiunti nel mezzo di crescita.

I risultati hanno fatto emergere una localizzazione più precisa e nitida della proteina ZIP9 a livello del plasmalemma e di tutto il sistema endosomiale. È stato inoltre possibile osservare numerose vescicole citoplasmatiche (figura 3.13).

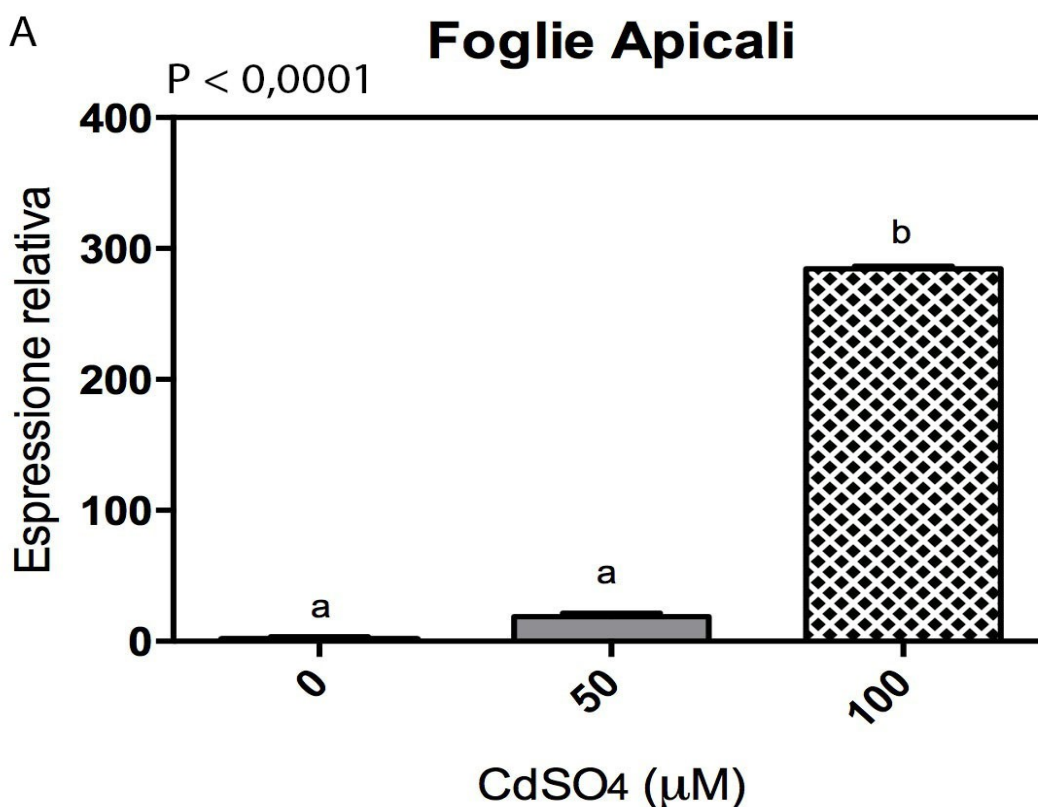


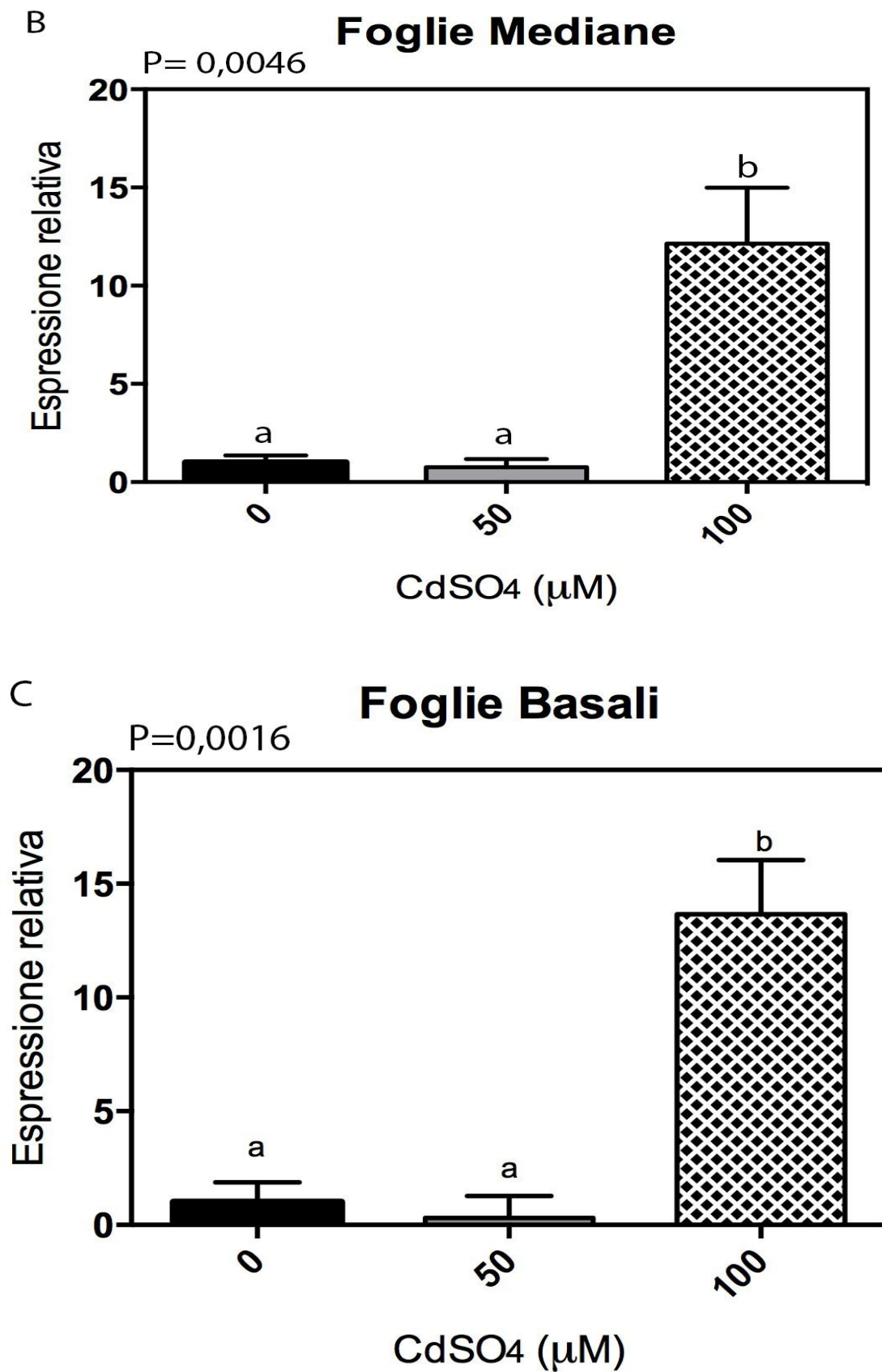
**Figura 3.13:** a; c) protoplasti di *Arabidopsis thaliana*, cresciuti in mezzo contenente 200 µM di zinco, trasfettati con il costrutto pAVA554-YFP-Zip9 visti al microscopio confocale con luce fluorescente; b; d) protoplasti di *Arabidopsis thaliana*, cresciuti in mezzo contenente 200 µM di zinco, trasfettati con il costrutto pAVA554-YFP-zip9 osservati al microscopio confocale con luce visibile. La barra è 10 µm. Le frecce nel riquadro c indicano le vescicole citoplasmatiche.

### 3.4 Analisi dei livelli di espressione del gene *zip9* nelle foglie di *Populus alba* clone Villafranca sottoposto a trattamento con CdSO<sub>4</sub>.

Mediante reazioni di RT-qPCR è stato possibile analizzare i livelli di espressione del gene *zip9*, nelle foglie basali, mediane ed apicali soggette a trattamento con 50 µM e 100 µM di Cd rispetto alle foglie di controllo non trattate (figura 3.14).

I risultati di queste analisi hanno evidenziato, in tutte le foglie delle piante trattate con 100 µM di CdSO<sub>4</sub>, una sovra espressione significativa del gene *zip9* rispetto a quella del gene housekeeping EF1α. Particolarmente significativa è risultata la sovra espressione del gene nelle foglie apicali.





**Figura 3.14:** Analisi dei livelli di espressione del gene *zip9*, nelle foglie apicali (A), mediane (B) ed basali (C), di *Populus alba* L. clone Villafranca soggetto a trattamento con 50 µM e 100 µM di Cd aggiunti al

mezzo. I dati sono stati riportati come media  $\pm$  SEM (n=3). Lettere diverse indicano differenze significative tra i trattamenti ( $p \leq 0,05$ ).

## Discussione

Questo lavoro di tesi è parte di un progetto atto alla caratterizzazione dei geni di pioppo diversamente espressi in risposta a quantità sub letali di metalli pesanti iniziato mediante high-throughput screening con; microarray nelle foglie (Di Baccio et al., 2011) e RNAseq nelle radici (Ariani et al., 2015).

In particolare, nel lavoro di RNAseq sopra citato, risultava una sovra espressione del gene *zip9* nell'apparato radicale di *Populus x canadensis* in condizioni di eccesso di Zn. Questo risultato aveva portato gli autori ad ipotizzare un ruolo di questo trasportatore nell'assorbimento del metallo in questione.

Poiché nel lavoro di Ariani et al. (2015) l'espressione del gene *zip9* era stata osservata unicamente mediante qRT-PCR, questo lavoro ha previsto il clonaggio e la caratterizzazione preliminare del gene, seguito dalla sua localizzazione cellulare in protoplasti di *Arabidopsis thaliana* e dall'analisi di espressione nelle foglie di *Populus alba* L. clone Villafranca cresciuto in condizioni di eccesso di Cd nel terreno.

I risultati del sequenziamento del clonaggio del cDNA di *zip9* hanno messo in evidenza la presenza di un'unica isoforma del gene poiché tutte le colonie analizzate mostravano un'omologia di sequenza pari al 100% e dai risultati dell'amplificazione è stato visto che *zip9* ha una lunghezza pari a 1002 bp.

Grazie all'utilizzo di analisi ed allineamento Clustal, è stato possibile confrontare la sequenza di *zip9* con l'RNA messaggero dell'hypotetical protein (POPTR\_009s03950) dell'organismo modello di riferimento *Populus trichocarpa* riscontrando un'omologia del 99%.

Sono osservabili sei transizioni di basi: due A < G, una C < T, una C < G, una A < C ed una T < A.

La proteina codificata dal gene in studio è composta da 333 amminoacidi e differisce per un solo amminoacido dalla proteina omologa di *Populus trichocarpa*.

In particolare, la proteina ZIP9 presenta un'Arginina, codificata dal codone AGG, mentre la proteina omologa di *Populus trichocarpa* presenta una Lisina, codificata dal codone AAG. Entrambi gli amminoacidi sono polari ed a carattere basico.

Quest'ultima proprietà è determinata, nel primo caso, da un gruppo guanidinico mentre nel secondo da un gruppo ammidico.

Si può ipotizzare, essendo gli amminoacidi simili per basicità ed ingombro sterico, che le due proteine in questione presentino caratteristiche fisico-chimiche e strutturali simili.

Mediante l'analisi dei domini conservati, attuata con il web server NCBI, è stato possibile confermare l'appartenenza del nostro gene alla superfamiglia degli “ZIP Zinc transporter” codificanti per proteine responsabili del trasporto cationico a livello della membrana.

In particolare, la proteina ZIP9 presenta dall'amminoacido 50 all'amminoacido 330 il dominio ZIP contenente 8 domini transmembrana nonché una regione variabile tra il terzo ed il quarto dominio transmembrana dotata di un residuo di istidina che potrebbe rappresentare un potenziale sito di legame per i cationi bivalenti (Guerinot, 2000).

In questo lavoro di tesi, è emerso che ZIP9 è in grado di legare e trasportare sia ioni  $Zn^{2+}$  che  $Cd^{2+}$ .

Questo dato risulta in accordo con la letteratura secondo la quale gli ZIP transporter sono trasportatori non selettivi ossia in grado di contrarre legame e trasportare non solo lo  $Zn^{2+}$  ma anche altri ioni bivalenti (Guerinot, 2000).

Ne sono un esempio l'omologo del gene *zip3*, *AtIRT1*, e l'omologo del gene *zip4*, *AtZIP7*, che risultano coinvolti nell'assorbimento di metalli diversi dallo zinco nell'apparato radicale di *Arabidopsis* (Grotz *et al.*, 1998; Hall e Williams, 2003).

Una delle tecniche maggiormente utilizzate per la visualizzazione della localizzazione a livello subcellulare della proteina di interesse è la trasfezione di protoplasti con opportuni vettori di

espressione (Denecke et al., 2012).

Nel caso di studio di localizzazione proteica è stata da noi utilizzata la YFP come reporter.

Dall'analisi dei risultati di localizzazione della proteina in studio, in presenza ed in assenza di Zn in eccesso nel mezzo di crescita, è emerso che la proteina si localizza in modo diffuso nel citoplasma e nel plasmalemma dei protoplasti di *Arabidopsis thaliana*.

Le scelte di far crescere i protoplasti anche in presenza di dosi sub letali di zinco è derivata da risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio riguardanti le due isoforme della proteina UPR51 (appartenenti anch'esse alla famiglia dei trasportatori ZIP) in cui è stata osservata una ricolocalizzazione delle due proteine in presenza di 200  $\mu$ M di zinco nel mezzo di crescita rispetto al mezzo di controllo. Nello specifico, i risultati avevano evidenziato, in presenza di Zn, una riduzione della localizzazione delle due isoforme a livello del plasmalemma per favorire una maggiore concentrazione citoplasmatica.

Le cellule trasfettate presentavano, inoltre, dei segni di sofferenza se cresciute nel mezzo di controllo a causa dell'effetto della sovra espressione che probabilmente rimuove il microelemento dal mezzo stesso rendendolo limitante per le cellule. In presenza di dosi sub letali di Zn, al contrario, le cellule trasfettate risultavano morfologicamente normali.

A differenza dello studio sopracitato, nel caso della proteina ZIP9, i protoplasti risultavano vitali, delle giuste dimensioni ed esibivano una morfologia perfettamente sferica, non mostrando perciò alcun sintomo di sofferenza in entrambe le condizioni di crescita.

Per quanto riguarda la localizzazione, sia in assenza che in presenza di zinco in eccesso, ZIP9 risulta uniformemente diffusa nel sistema endosomiale e nel plasmalemma con la differenza che, nel secondo caso, è stato possibile osservare numerose vescicole citoplasmatiche, probabilmente piccole unità vacuolari adibite allo storage dello Zn.

Questa ipotesi è in accordo con la letteratura riguardante la capacità di *Arabidopsis* di accumulare lo Zn in eccesso nei vacuoli (Morel et al., 2008; Alpi et al., 2000).



I risultati della localizzazione della proteina ZIP9 risultano parzialmente coerenti con quanto riportato sulle proteine ZIP di riso, localizzabili nel plasmalemma (Young et al., 2009) e su quelle della stessa *Arabidopsis thaliana*, localizzabili a livello vacuolare e del plasmalemma (Milner et al., 2012), e sulle proteine ZIP di mais, localizzabili nel reticolo endoplasmatico e nel plasmalemma (Li et al., 2013).

Ulteriori esempi di localizzazione cellulare di trasportatori ZIP in presenza di Zn sono rappresentati dall'omologo di *zip1*, detto *AtZip1*, in *Arabidopsis* che si localizza principalmente nel vacuolo (Milner et al., 2013); dall'omologo di *zip10*, *AtZTP29*, in *Arabidopsis* che si localizza sulla membrana del reticolo endoplasmatico in caso di stress salino (Wang et al., 2011) e dall'omologo di *zip11*, *AtIAR1*, in *Arabidopsis*, che si localizza a livello del reticolo endoplasmatico (Rampey et al., 2013).

La localizzazione della proteina ZIP9 in tutto il sistema endosomiale, anche in presenza di zinco nel mezzo di crescita, potrebbe essere attribuibile ad una implicazione della proteina stessa sia nei meccanismi di sequestro e compartimentalizzazione dello zinco negli organelli citoplasmatici, sia nel meccanismo di esclusione di quest'ultimo.

I dati di localizzazione suddetti sono da ritenersi preliminari ad una futura colocalizzazione con marcatori compartimento-specifici.

In particolare, potrebbero essere utilizzati diversi costrutti aventi la cyan fluorescent protein (CFP) in frame con i marcatori degli organuli citoplasmatici ed il costrutto recante la proteina YFP in frame con la proteina ZIP9 per co-trasfettare i protoplasti di *Arabidopsis*.

Per quanto riguarda l'analisi dei livelli di espressione del gene *zip9* nelle foglie apicali, mediane e basali delle piante di *Populus alba* L. clone Villafranca, fatte crescere in mezzi contenenti rispettivamente 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  di Cd, sono emerse differenze significative rispetto al controllo.

In particolare, si riscontra una sovra espressione significativa del gene *zip9* in tutte le tipologie di foglie appartenenti a piante trattate con concentrazioni di Cd pari a 100  $\mu\text{M}$ , se pur con maggiore

rilevanza nelle foglie apicali piuttosto che in quelle mediane e basali.

Questo dato, essendo le piante in grado di accumulare i metalli pesanti in regioni non coinvolte in processi metabolici essenziali (Di Baccio et al., 2003) e concentrandosi il cadmio maggiormente a livello delle radici e dello stelo piuttosto che nelle foglie (Pietrini et al., 2010; Elobeid et al., 2012), ci porta ad ipotizzare che la sovra espressione della proteina ZIP9, in caso di elevate concentrazioni di cadmio nel terreno, sia atta non tanto ad aumentare l'assorbimento del metallo in questione a livello fogliare, quanto a diminuirne la concentrazione nei comparti metabolicamente più attivi di questo organo, al fine di eliminare gli effetti dannosi provocati dal metallo stesso.

La sovra espressione di trasportatori ZIP in presenza di metalli pesanti è stata descritta anche in precedenti studi tra cui quello di Rascio e Navarri-Izzo (2011), in cui si descrivono le strategie adottate dalle piante iperaccumulatrici in presenza di alte concentrazioni di metalli pesanti, e quello di Sasaki et al. (2014), in cui cinque membri della famiglia ZIP (OsZIP4, OsZIP5, OsZIP8, OsZIP9, OsZIP10) erano up-regolati nella linea di riso, avente l'ATPasi OsHMA3 sovra espressa, trattata con concentrazioni crescenti di Zn e dosi sub letali di Cd. In particolare, sembra che le OsZIP siano up-regolate al fine di mantenere costante il livello di Zn all'interno dei germogli di riso anche nel caso in cui siano presenti alte concentrazioni del metallo nel mezzo di crescita.

L'ipotesi secondo cui le ZIP servono ad escludere il Cd dai comparti metabolicamente più attivi risulterebbe in accordo con lavori precedenti secondo cui il cadmio, oltre una certa concentrazione, non solo inibirebbe la biosintesi delle clorofille in foglie giovani e la loro degradazione nelle foglie più vecchie (Parmar et al., 2013), ma provocherebbe anche danni ai sistemi fotosintetici coinvolti sia nella fase oscura che in quella luminosa (Andersen e Kupper, 2013).

Il maggiore livello di sovra espressione di *zip9* nelle foglie apicali (circa 284 volte il livello di espressione del gene nel controllo) rispetto a quello delle foglie basali e mediane (rispettivamente di 14 e 12 volte circa il livello di espressione del gene nel controllo) potrebbe essere attribuito, in accordo con i lavori sopra citati, alla necessità della pianta di prevenire eventuali danni causati dal

Cd ai sistemi fotosintetici, la cui funzionalità risulta maggiore nelle foglie apicali rispetto alle altre due tipologie fogliari.

Inoltre, la differenza di sovra espressione del gene *zip9* rispettivamente nelle foglie basali, mediane ed apicali, risulta essere parzialmente in accordo con i risultati di studi precedenti, in cui era stato possibile osservare decrescenti livelli di concentrazione del cadmio dalle foglie basali a quelle apicali (Fagioni e Zolla 2009; Cosio et al., 2005), poiché l'aumento della concentrazione di Cd nelle foglie delle piante trattate non segue il gradiente di concentrazione suddetto ma presenta piuttosto livelli di concentrazione maggiori nelle foglie basali ed apicali, e minori nelle foglie mediane.

L'importante ruolo della proteina ZIP9 nelle foglie apicali sopra ipotizzato risulta in accordo con un altro studio condotto sulle stesse piante di *Populus alba* clone Villafranca da noi utilizzate, in cui le foglie in questione non mostravano cambiamenti nella concentrazione di molecole antiossidanti quali l'ascorbato (AsA) ed il glutathione (GSH) dopo l'esposizione al cadmio, suggerendo la presenza di un meccanismo efficiente di rimozione dello stesso (Rome et al., 2015).

Un altro dato del medesimo studio mette in evidenza che in tutte e tre le tipologie di foglie delle piante trattate con CdSO<sub>4</sub>, era presente un accumulo significativo in termini di µg di Cd rispetto al controllo. La concentrazione di Cd al livello fogliare delle piante trattate, se pur aumentata all'aumentare della concentrazione di CdSO<sub>4</sub> nel mezzo di crescita, risultava però essere sempre inferiore alla soglia di tossicità, pari a 5 µg g<sup>-1</sup> dry weight (DW), stimata in uno studio di White e Brown (2010).

In particolare, si discostavano significativamente dalla concentrazione di Cd nel controllo, inferiore a 0,8 µg g<sup>-1</sup>, i seguenti dati: nelle foglie apicali trattate con 50 µM di Cd, si aveva una concentrazione di quest'ultimo pari a 2 µg g<sup>-1</sup>, nelle foglie apicali trattate con 100 µM di Cd, si aveva una concentrazione di Cd inferiore a 3 µg g<sup>-1</sup>, nelle foglie mediane trattate con 100 µM di Cd si aveva una concentrazione superiore a 2 µg g<sup>-1</sup>, nelle foglie basali trattate 50 µM di Cd si aveva

una concentrazione superiore a  $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ , ed, infine, nelle foglie basali trattate con  $100 \mu\text{M}$  di Cd si aveva una concentrazione inferiore a  $4,5 \mu\text{g g}^{-1}$  sul peso secco della foglia (DW).

Poiché nello studio è possibile osservare che la concentrazione di Cadmio nelle foglie aumenta all'aumentare della concentrazione dello stesso nel mezzo di coltura, la sovra espressione del gene *zip9* potrebbe, quindi, consentire la rimozione dello ione metallico dal citosol ed il suo stoccaggio all'interno di compartimenti cellulari specifici. Una volta compiuto l'assorbimento, il cadmio potrebbe essere legato da agenti chelanti che sarebbero responsabili della sua detossificazione. Ne sono un esempio le MT osservate in *Arabidosis* da Murphy e Taiz (1995) e l'acido citrico, osservato da Rauser (1999) nel distretto vacuolare, in grado di legare il  $\text{Cd}^{2+}$  anche quando vi è una bassa concentrazione di quest'ultimo.

## Conclusioni e prospettive future

Questa tesi è stato un lavoro atto alla caratterizzazione preliminare del gene *zip9* che codifica per una proteina transmembrana appartenente alla famiglia delle proteine ZIP, i cui membri sono in grado di trasportare diversi ioni bivalenti tra cui gli ioni  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$ .

Questo gene sembra coinvolto in una delle strategie di tolleranza a livelli sub letali di metalli attuate dalle piante di *Populus*: il meccanismo di esclusione cellulare del metallo attraverso processi di sequestro e compartimentalizzazione. Gli esperimenti di localizzazione cellulare hanno mostrato la presenza della proteina ZIP9 sia a livello del plasmalemma che di tutto il reticolo endoplasmatico, sia in presenza che in assenza di Zn.

Sarà rilevante condurre studi più approfonditi per comprendere l'esatta localizzazione subcellulare della proteina ZIP9 e per comprendere il ruolo specifico che ricopre nella risposta a stress causato dall'inquinamento da metalli. L'utilizzo di piante di pioppo transgeniche sovra esprimenti *zip9* sarà necessario per effettuare tale studio.

In conclusione, anche lo studio delle altre classi di trasportatori sarebbe utile al fine di comprendere

il meccanismo di omeostasi dei metalli nelle piante. I risultati da noi ottenuti, infatti, sono determinati non solo dai livelli di concentrazione dei diversi metalli all'interno della pianta e dall'effetto che questi hanno sulla funzionalità dei singoli trasportatori quando presenti in contemporanea nello stesso distretto, ma anche dalla specificità di legame dei singoli trasportatori e dalle varie interazione a carattere positivo (cooperazione) o negativo (competizione) che questi possono avere gli uni con gli altri.

## Bibliografia

- Adriano Domy C. Cadmium. (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments; 263-314.
- Ahmed H, Häder DP. (2010) Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena Gracilis*. *Environ Exp Bot*; 69: 68-75.
- Alloway BJ. (2008) Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ Geochem Health*; 31 :537-548.
- Alpi A., P. Pupillo, C. Rigano 2000 - Fisiologia delle piante. Ed. EdiSES 35-37.
- Andresen E, Kupper H. (2013) Cadmium toxicity in plants. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, Cadmium: From Toxicity to Essentiality. Springer; 395-413.
- Ariani A, Di Baccio D, Romeo S, Lombardi L, Andreucci A, Lux A, Horner DS, Sebastiani L. (2015) RNA Sequencing of *Populus x canadensis* Roots Identifies Key Molecular Mechanisms Underlying Physiological Adaption to Excess Zinc. *PLoS one*; 10(2): e0117571.
- Azevedo RA, Gratão PL, Monteiro CC, Carvahlo RF. (2012) What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? *Food Energy Secur*; 1: 133-140.
- Baker AJM, Mc Grath SP, Sidoli GMD, Reeves RD. (1991) In situ decontamination of heavy metal polluted soil using crops of metal-accumulating plants -a feasibility study. In: Hincee RF, Olfenbuttel RF, editors. In situ bioreclamation. Boston: Butterworth-Heineann;

600-5.

- Baker AJM, Mc Grath SP, Sidoli GMD, Reeves RD. (1994) The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resour Conserv Recycl*; 11: 41-9.
- Banuelos GS, Ajwa HA, Mackey LL, Wu C, Cook S, Akohoue S. (1997) Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. *J Environ Qual*; 26: 784-97.
- Bert V, Meers P, Saumitou- Laprade P, Salis P, Gruber W, Verbruggen N. (2003) Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation of *Arabidopsis halleri* . *Plant Soil*.; 249: 9-18.
- BIO-WISE. (2000) Contaminated land remediation: a review of biological technology. London: DTI.
- Blum WH. (1997) Cadmium uptake by higher plants. In: proceedings of extended abstracts from the Fourth International Conference on Biogeochemistry of trace elements; 109-110.
- Brooks RR, Morrison SS, Reeves RD, Dudley TR, Akman Y. (1979) Hyperaccumulation of mikel by *Alyssum Lannaeus* (Cruciferae). *Proc R Soc Lond*; 203: 387-403.
- Burken JG, Schnoor JL. (1997) Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environ Sci Technol*; 31: 1399-406.
- Burken JG, Schnoor JL. (1999) Distribution and volatilization of organic compounds following uptake by hybrid poplar trees. *Int J Phytoremediat*; 28: 1709-19.
- Chaney RL, Malik KM, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS. (1997) Phytoremediation of soil metal. *Curr Opin Biotechnol*; 8: 279-84.
- Clarkson DT, Luttge U. (1989) Mineral nutrition. Divalent cations, transport and compartmentalization. *Prog. Bot.*; 51: 93-112.
- Cobbett CS. (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*; 3: 211-216.

- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV. (1998) The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. *Plant physiol*; 116: 1063-1072.
- Cohen K, Garvin DF, Kochian LV. (2004) Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta*; 218: 784-792.
- Confalonieri M, Balestrazzi A, Bisoffi S, Carbonera D. (2003) In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 72: 109-138.
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C. (1992) COT1 a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*; 12: 3678-3688.
- Cooper EM, Sims JT, Cunningham SD, Huang JW, Berti WR. 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J Environ Qual*; 28: 1709-1719.
- Cosio C, DeSantis L, Frey B, Diallo S, Keller C. (2005) Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot*; 412: 765-775.
- Di Lonardo S, Capuana M, Arnetoli M, Gabbriellini R, Gonnelli C. (2011) Exploring the metal phytoremediation potential of tree *Populus alba* L. clones using an in vitro screening. *Environ Sci Pollut Res Int*; 18(1): 82-90.
- Dickinson NM, Turner AP, Watmough SA, Lepp NW. (1992) Acclimation of trees to pollution stress: cellular metal tolerance traits. *Ann Bot*; 70: 596-572.
- Drew AP, Guth RL, Greatbatch W. (1987) Variation in heavy metal accumulation by hybrid poplar clones on sludge amended soil. Poplar culture to the year 2000. Proceedings of the Poplar Councils of the USA and Canada Joint Meeting; 109-117.
- Duffus JH. (2002) “Heavy metals” a meaningless term? ( IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*; 5: 793-807.
- Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H, Raskin I. (1995) Rhizofiltration: the use of the

- plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ Sci Technol*; 29: 1239-45.
- Edwin FG, Hall MA, De Klerk GJ. (2008) The components of plant Tissue Culture Media I: Macro – and Micro-Nutrients. *Plant Propagation by Tissue Culture* ; pp65-113.
  - Eide D, Broderius M. Fett J, Guerinot ML. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants indentified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 5624-5628.
  - Elobeid M., Gobel C, Feussner I, Polle A. (2012) Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *J Exp Bot*; 63: 1413–1421.
  - Fagioni M., Zolla L. (2009) Does the different proteomic profile found in apical and basal leaves of spinach reveal a strategy of this plant toward cadmium pollution response? *J Prot Resear.*; 8: 2519-2529.
  - Favas PJC, Pratas J, Varum M, D'Souza R, Paul MS. (2014) Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*; 485-517.
  - Florianczyk B Trojanowski T. (2008) Zinc transporting proteins. *Journal of chinese clinical medicine* volume 3, number 11; 657-660.
  - Fodor A, Szabò- Nagi A, Erdei L. (1995) The Effect of cadmium on fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J. Plant Physiol*; 14:787-792.
  - Fagioni, M., Zolla, L. (2009) Does the different proteomic profile found in apical and basal leaves of spinach reveal a strategy of this plant toward cadmium pollution response? *J Prot Resear*; 2519-2529.
  - Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. (1999) Effect of cadmium ions on antioxidant defence system in sunflower cotyledons. *Biol. Plant*; 42: 49-55.
  - Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involmente on oxidative stress. *Plant Sci*; 121: 151-159.



- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 6838-6842.
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant. Sci*; 161: 481-488.
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 95: 7220–72
- Guerinot ML. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta*; 1465:190-198.
- Haghiri F. (1973) Plant uptake of cadmium as influenced by cation exchange capacity, organic matter, zinc and soil temperature. *J. Environ Qual*; 2: 93-96.
- Hall JL, Williams LE. (2003) Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*. Volume 54; 393: 2601-2613.
- Hernandez LE, Càrpena -Ruiz R, Garate A. (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J. Plant Nutr*; 19: 1581-1598.
- Ishiara K, Hamada H, Hirata T, Nakajima N. (2003) Biotransformation using plant cultured cells: *Journal of Molecular Catalysis*; 23 (2-6): 145-170.
- Kondo N, Imai K, Isobe M, Goto T, Murasugi A, Wada-akawa C, Hayashi Y. (1984) Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast – separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedon Lett*; 25: 3869-3872.
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB. ( 1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol*

40: 37-44.

- Krebs RE. (2006) The History and Use of Our Earth's Chemical Elements. A Reference Guide. Greenwood Press Westport, Connecticut London; 449.
- Kumar PBAN, Duchenkov V, Motto H, Rasakin I. (1995) Phitoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. Environ Sci Technol; 29:1232-8.
- Lasat MM, Pence NS, Garvin DF, Ebbs SD, Kochian LV. (2000) Molecular physiology of zinc transport in the Zn Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. J. Exp. Bot; 51: 71-79.
- Lepp NW. (1996) Uptake, mobility and loci of concentrations of heavy metals in trees. In: Glimmerveen I, editor. Heavy metal and trees. Proceedings of a Discussion Meeting, Glasgow. Edinburgh: Institute of Chartered Foresters; 68-82.
- Lettens S, Vandecasteele B, De Vos B, Vansteenkiste D, Verschelde P. (2011) Intra- and inter-annual variation of Cd, Mn and Cu in foliage of poplars on contaminated soil. Science of the Total Environment; 409: 2306-2316.
- Li L, Kaplan J. (1998) Defects in the yeast high affinity iron transport system increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. J Biol Chem; 271: 22181-22187.
- Martin I, Bardos P. (1996) Final report: review of full scale treatement technologies for the remediation of contaminated soil. Report for the royal commission on environmental pollution.
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu U, Müller-Röber B, Schulz B. (2001) Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. Planta; 3: 345-355.
- Mcfarlane GR, Burchett MD. (2001) Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicartors of heavy metal stress in greymangrove, *Avicenna marina* (Forsk.). Viehr.Mar.Pollut. Bull; 42: 233-240.

- Mengel K, Kirkby EA. (2001) Principles of plant nutrition; 111-179.
- Milner M.J, Seamon J, Craft E, Kochian LV. (2013) Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of experimental botany*; 64: 369–81.
- Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A and Richaud P. (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in *Arabidopsis*. *Physiology* February; 149(2): 894-90.
- Murphy A, Taiz L. (1995) Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiol*; 113: 1293-1301.
- Nevo Y, Nelson N. (2006) The NRAMPs family of metal-ions transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*; 1763: 609-620.
- Nies DH. (1992) Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid*; 27: 17-28.
- Parkinson A. (2006) Biotransformation of xenobiotics; 6: 133-223.
- Parmar P, Kumari N, Sharma V. (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies*; 54: 45-51.
- Peng J, Song Y, Yuan P, Cui X, Qiu G. (2009) The remediation of heavy metal contaminated sediment. *Journal of Hazardous Materials*; 161: 633-640.
- Pietrini F, Zacchini M, Iori V, Pietrosanti L, Bianconi D, Massacci A. (2010) Screening of poplar clones for cadmium phytoremediation using photosynthesis, biomass and cadmium content analyses. *Int J Phytoremediat*; 12: 105-120.
- Pinto AP, Mota AM, de Varennes A, Pinto FC. (2004) Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci. Tot. Environ.*; 326: 239-247.

- Punshon T, Dickinson NM, Lepp NW. 1996. The potential of *Salix* clones for bioremediating metal polluted soil. In: Glimmerveen I, editor. Heavy metal and trees. Proceedings of a Discussion Meeting, Glasgow. Edinburgh: Institute of Chartered Foresters; 93-104.
- Rampey RA, Baldrige MT, Farrow DC, Bay SN, Bartel B. (2013) Compensatory mutations in predicted metal transporters modulate auxin conjugate responsiveness in *Arabidopsis*. G3 (Bethesda, Md); 3: 131–41.
- Rascio N, Navari-Izzo F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.*; 180(2): 169-81.
- Rasmussen L D, Zawadsky C, Binnerup SJ, Øregaard G, Sørensen SJ, Kroer1 N. (2008) Cultivation of hard-to-culture subsurface mercury-resistant bacteria and discovery of new merA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*; 12: 3795-3803.
- Rauser WE, Muwly P. (1995) Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiology*; 109: 195-202.
- Rauser We. (1999) Structure and function of of metal chelator produced by plants. *Cell Biochem Biophys*; 31: 19-48.
- Robinson NJ, Tommey Am, Kuske C, Jackson PJ. (1993) Plant metallothioneins. *Biochem J*; 295: 1-10.
- Rock S, Sayre PG. (2000) Regulatory considerations for phytoremediation. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment 1*; 43-49.
- Rogers, EE, Eide DJ, Guerinot ML. (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 97 (22): 12356-12360.
- Romé C, Romeo S, Francini A, Andreucci A, Sebastiani L. (2015) Leaves position in *Populus alba* Villafranca clone reveals a strategy towards cadmium uptake response. *Environmental and Experimental Botany*. submitted.

- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. (1995) Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol*; 109: 1427-1433.
- Salt DE, Rauser WE. (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol*; 107: 1293-1301.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. (1998) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol*; 49: 643-68.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot*; 52: 2115-2126.
- Sanità di Toppi L, Gabrielli R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*; 41: 105-130.
- Sasaki A, Yamaji N, Feng Ma J. (2014) Overexpression of OsHMA3 enhances Cd tolerance and expression of Zn transporter genes in rice. *Journal of Experimental Botany*; 65(20): 6013-6021
- Schneider T, Schellenberg M, Meyer S, Keller F, Gehrig P, Riedel K, Martinoia E. (2009) Quantitative detection of changes in the leaf-mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Proteomics*; 9(10): 2668-2677.
- Senden MHMN, Van der Meer AJGM, Verburg TJ, Wolterbeek HT. (1992) Effects of cadmium on the behaviour of citric acid in isolated tomato xylem cell walls. *J. Exp. Bot*; 45: 597-606.
- Sharma J, Chakraverty N. (2013) Mechanism of Plant Tolerance in Response to Heavy Metals. *Molecular Stress Physiology of Plants*; 289-308.
- Shaw BP. (1995) Effect of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biol. Plant*; 37: 587-596.

- Smith RAH, Bradshaw AD. 1972. Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant populations. *Tans Ist Min Metall, Seet A*; 81: 230-7.
- Staff S S. (1999) Soil taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. Washington, DC: Natural Resources Conservation Service.
- Stobart AK, Griffiths W, Bukhari IA, Sherwood RP. (1985) The effect of  $Cd^{2+}$  on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant*; 63: 293-298.
- Stohs SJ, Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med*; 18:321-336.
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI. (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 4491-4996.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev L, Hellsten U, Henrissat B. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*; 313(5793): 1596-1604.
- UNEP United Nations Environment Programme environment for development. (2010) Annual report: harmful substances and hazardous waste; 80-86.
- Van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonens AN, Schat H, Verkleij JA, Hooykaas PJ. (1999) Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol*; 119: 1047-1056.
- Vangronsveld J, van Assche F, Clijsters H. (1995) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environ Pollut*; 87: 51-9.
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ. (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for

cadmium binding peptides. *Plant Physiol*; 92: 1086-1093.

- Wagner GJ. (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron*; 51: 173-212.
- Wang M, Xu Q, Yuan M. (2011) Zinc homeostasis is involved in unfolded protein response under salt stress. *Plant signaling & behavior*; 6: 77–9
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C. (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis; 278(48):47644-53.
- Yang Z, Chengcai C. (2011) Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. *Abiotic Stress in Plants -Mechanism and Adaptation* ; 978-953-307- 394-1.
- Li-Hua Yu LH, Umeda M, Liu JY, ZhaoNM, Uchimiya H. (1987) A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene*; 206(1): 29-35.
- Zacchini M, Pietrini F, Scarascia Mugnozza G, Iori V, Pietrosantini L, Massacci A. (2008) Metal tolerance , accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air Soil Pollut*; 197: 23-34.